

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Žofie Počtová

Studium komplexace vortioxetinu s nativními cyklodextriny a vývoj
metody pro jeho stanovení kapilární elektroforézou

Study of vortioxetin complexation by native cyclodextrins and its determination
using capillary electrophoresis

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Tomáš Křížek, Ph.D.

Praha 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně, že jsem uvedla všechny použité zdroje informací a že práce nebyla předložena za účelem získání jiného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že využití získaných výsledků mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze s písemným souhlasem univerzity.

V Praze dne 17.4.2017

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce RNDr. Tomáši Křížkovi, Ph.D. za ochotu, vstřícnost a cenné rady při řešení problematiky spojené s touto prací.

Abstrakt

V této práci je zkoumáno, zda tvoří aktivní látka vortioxetin supramolekulární komplex s nativními cyklodextriny (α , β , γ) a je zjišťováno, jakou hodnotu má konstanta stability vznikajícího komplexu. V úvahu je brána stechiometrie interakce cyklodextrinu s vortioxetinem 1:1 a 2:1. Výsledky naznačují, že u všech použitých cyklodextrinů je vhodnější uvažovat stechiometrický poměr cyklodextrinu k vortioxetinu 1:1 a že nejstabilnější komplex tvoří vortioxetin s β -cyklodextrinem.

Dále je vyvinuta metoda stanovení vortioxetinu v tabletě s použitím kapilární elektroforézy v nevodném prostředí. Je ověřena preciznost, přesnost a robustnost metody a jsou určeny hodnoty meze detekce a meze kvantifikace. Jelikož je separace v kapilární elektroforéze založena na jiném principu než v HPLC, může tato metoda posloužit k ověření výsledků získaných na HPLC.

Je zkoumána stabilita vortioxetinu za podmínek zvýšené teploty a vlhkosti ve formě prášku samotného vortioxetinu a vortioxetinu s excipienty.

Abstract

In this master thesis, the formation of supramolecular complexes between vortioxetine active substance and cyclodextrins (α , β , γ) is examined and the stability constants of these complexes are determined. The stoichiometric ratios of cyclodextrin and vortioxetine 1:1 and 2:1 are considered. The results suggest that the 1:1 ratio of cyclodextrin and vortioxetine is more accurate for each of used cyclodextrins and that the strongest interaction is between vortioxetine and β -cyclodextrin.

Further, a method for vortioxetine assay in a tablet is developed by using non-aqueous capillary electrophoresis technique. The precision, accuracy, and robustness are validated and the values of detection and quantification limits are determined. This method can be used as a verification method for the results obtained by HPLC as the separation principle is different in capillary electrophoresis.

Also, the stability of vortioxetine as a pure powder and as a mixture with excipients is examined under the conditions of elevated temperature and humidity.

Obsah

1.	Cíle práce	6
2.	Teoretický úvod	7
2.1	Vortioxetin	7
2.1.1.	Vlastnosti	7
2.1.2.	Farmaceutické využití	7
2.1.3.	Metody stanovení vortioxetinu	8
2.2.	Kapilární elektroforéza v nevodném prostředí	11
2.3.	Studie stability léčivých přípravků	11
2.3.1.	Způsoby testování	11
2.3.2.	Typy stabilitních testů	12
2.4.	Cyklodextriny	13
2.4.1.	Vlastnosti cyklodextrinů	13
2.4.2.	Využití cyklodextrinů	14
2.4.3.	Konkrétní příklady využití cyklodextrinů	15
2.5.	Stanovení konstanty stability supramolekulárních komplexů cyklodextrinů	17
3.	Experimentální část	20
3.1.	Použité přístroje a chemikálie	20
3.2.	Určení stability supramolekulárního komplexu vortioxetinu s cyklodextrinem ..	20
3.2.1.	Podmínky měření	20
3.2.2.	Provedená měření	21
3.3.	Vývoj metody pro stanovení vortioxetinu a její použití pro ověření stability tablety	22
3.3.1.	Podmínky měření	22
3.3.2.	Zjištění případné interference excipientů	23
3.3.3.	Kalibrační závislost	24
3.3.4.	Měření kontrolních a stabilitních vzorků	26

4.	Výsledky a diskuze	29
4.1.	Určení stability supramolekulárního komplexu vortioxetinu s cyklodextrinem..	29
4.2.	Vývoj metody pro stanovení vortioxetinu a její použití pro ověření	
	stability tablety	35
4.2.1.	Vývoj metody a naměření kalibrační závislosti.....	35
4.2.2.	Měření kontrolních a stabilitních vzorků.....	41
5.	Závěr	45
6.	Použité zkratky.....	46
7	Literatura.....	47

1. Cíle práce

Cílem této práce je zjistit za použití kapilární elektroforézy, zda tvoří farmaceuticky významná látka vortioxetin supramolekulární komplex s nativními cyklodextriny a který z těchto cyklodextrinů je pro komplexaci nejvhodnější.

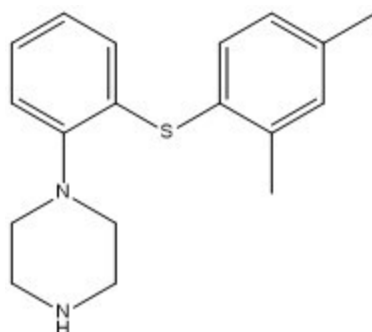
Jelikož doposud popsané metody stanovení vortioxetinu využívají systém HPLC, dalším cílem této práce je vyvinout metodu pro stanovení vortioxetinu s využitím kapilární elektroforézy a tuto metodu použít pro ověření stability vortioxetinu v tabletě.

2. Teoretický úvod

2.1 Vortioxetin

2.1.1. Vlastnosti

Vortioxetin je látka se sumárním vzorcem $C_{18}H_{22}N_2S$, molekulovou hmotností 298.45 g/mol a strukturou viz obr. 1. Ve farmacii je využíván ve formě hydrobromidové soli ($C_{18}H_{22}N_2S \cdot HBr$), což je bílý, nehygroskopický prášek, dobře rozpustný v methanolu a ethanolu a naopak málo rozpustný ve vodě a vodných roztocích. Jeho pK_A činí 9,1.⁵ Příprava hydrobromidové soli vortioxetinu pro farmaceutické účely obsahuje dva kroky syntézy, následnou rekrytalizaci a mletí.



Obrázek 1 Struktura vortioxetinu

2.1.2. Farmaceutické využití

Vortioxetin byl objeven vědci z Dánské společnosti Lundbeck, kteří publikovali článek o jeho přípravě v roce 2011.⁶ Následoval vývoj léku s vortioxetinem jako účinnou látkou a klinické testování. V roce 2013 povolilo FDA jeho distribuci v USA, distribuce v Evropě byla povolena o rok později. Obchodní název tohoto léku je Brintellix. (V USA byl název v roce 2016 změněn na Trintellix z důvodu možné záměny s léčivým přípravkem na ředění krve Brilinta). Jedná se o antidepresivum používané k léčbě depresivních epizod u dospělých pacientů.¹ Působí několika mechanismy, které zvyšují serotonergní aktivitu, ovlivňuje neurotransmitery, které vyvolávají i udržují depresivní poruchu. Vortioxetin je dobře absorbován po perorálním užití, plazmatická hladina dosahuje maxima během 7 až 11 hodin. Absolutní biologická dostupnost je 75 %. Ustáleného stavu plazmatické koncentrace se dosáhne zhruba za dva týdny.^{2,3,4}

Průměrný věk projevu první depresivní epizody je okolo 29 let, v poslední době však věkový průměr klesá. Ačkoli je k dispozici řada účinných antidepresiv, část pacientů léčbu antidepresivy netoleruje, kvůli jejich nežádoucím účinkům. Přestože nejsou náznaky, že by měl být vortioxetin účinnější než jiné antidepresivní látky, je klinicky výhodný z hlediska snášenlivosti. Vortioxetin byl zkoumán v krátkodobých i dlouhodobých klinických studiích. Z dlouhodobých studií nebyly v dávkách 2,5 mg/den, 5 mg/den ani 10 mg/den zjištěny žádné klinicky významné nálezy týkající se vitálních funkcí, tělesné hmotnosti, parametrů EKG nebo klinických laboratorních hodnot. Zdá se, že vortioxetin nemá negativní vliv ani na řízení, kognitivní a psychomotorické funkce.^{2,3,4}

Vortioxetin je distribuován ve formě potahovaných tablet obsahujících 5, 10, 15 nebo 20 mg vortioxetinu (ve formě hydrobromidové soli, $C_{18}H_{22}N_2S \cdot HBr$) nebo jako orální kapky obsahující 20 mg/mL vortioxetinu (ve formě laktátové soli, $C_{18}H_{22}N_2S \cdot C_3H_6O_3$ - kvůli zvýšení rozpustnosti v polárním prostředí). V tabletě jsou dále přítomny pomocné látky mannitol (E421), mikrokrytalická celulóza, hydroxypropylcelulóza, sodná sůl karboxymethylškrobu a stearat hořečnatý uvnitř tablety a v potahovaném filmu hydroxypropylcelulóza, macrogol 400, oxid titaničitý (E171) a oxid železitý (E172). Orální kapky dále obsahují hydroxypropylbetadex, ethanol (96 %) a vodu.⁵

Vortioxetin se podává v dávce 5-20 mg v závislosti na individuální odpovědi pacienta. Denní doporučená dávka je 10 mg. Užívání lze ukončit náhle bez nutnosti postupného snižování dávky.^{2,3,4}

2.1.3. Metody stanovení vortioxetinu

Podle dokumentu vydaného EMA – Evropskou lékovou agenturou (European Medicines Agency)⁵ byly vyvinuty metody pro identifikaci hydrobromidové soli vortioxetinu pomocí HPLC, FTIR a NIR, metoda stanovení pomocí HPLC, stanovení nečistot pomocí HPLC a GC a metoda stanovení reziduální rozpouštědel pomocí GC. Dále byla prokázána dostatečná stabilita produkovaných tablet. Stabilita byla testována po dobu 48 měsíců za podmínek 25 °C/60% vlhkost a po dobu 6 měsíců za podmínek 40 °C/75% rel. vlhkosti vzduchu.

V odborné literatuře jsem nenašla práci, která by se zabývala stanovením vortioxetinu za využití kapilární elektroforézy. Jsou ovšem popsány metody jeho stanovení, které využívají různé variace HPLC. Metody, jejichž účelem je stanovení nečistot vortioxetinu^{14, 16}, či stanovení vortioxetinu v biologických vzorcích.^{15, 17}

Například v roce 2015 byl vydán článek o nově vyvinuté HPLC metodě pro separaci a stanovení vortioxetinu a jeho možných nečistot vznikajících při syntéze. Separace byla provedena na HPLC s DAD detektorem s použitím C18 kolony (250 mm × 4,6 mm × 5 μm). Složka mobilní fáze A byla 0,05% trifluoroctová kyselina ve vodě a složka B acetonitril, byl použit gradientový eluční program v rozmezí A:B (v/v) 80/20 až 20/80 trvající 70 min. Vlnová délka detektoru byla nastavena na 230 nm a průtok na 1,0 ml/min, teplota kolony byla udržována na 35 °C. Trifluoroctová kyselina byla použita jako aditivum do mobilní fáze, aby plně protonizovala bazickou skupinu vortioxetinu a urychlila eluci polárních látek. Ukázalo se, že její koncentrace má významný vliv na chvostování všech zkoumaných analytů, optimální symetrie u všech analytů byla dosažena při její koncentraci 0,05%.

S využitím této metody byly provedeny degradační testy, kde byl vortioxetin vystaven kyselému prostředí (1M HCl) a bazickému prostředí (1M NaOH) při 100 °C po dobu 5 hodin, dále byl vystaven prostředí H₂O₂ (30%) za laboratorní teploty po dobu 24 hodin, dále byl vortioxetin jako prášek vystaven zvýšené teplotě (105°C po dobu 24 hodin) a UV záření.

Ověření čistoty píku pomocí DAD detektoru u degradačních vzorků ukázalo, že nedochází k překrývání žádného známého píku s neznámým píkem. Byly vypočteny hodnoty meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) jako poměr signálu k šumu 3:1 resp. 10:1 pro vortioxetin a sedm jeho nečistot. Hodnoty LOD se pohybovaly mezi 0,02 a 0,06 μg/ml (0,02 μg/ml pro vortioxetin) a hodnoty LOQ mezi 0,05 a 0,16 μg/ml (0,05 μg/ml pro vortioxetin).

Přítomnost a identita daných nečistot byla ověřena metodou LC-MS s použitím ESI ionizace v pozitivním módu, kde mobilní fáze i gradient byly stejné jako ve výše zmíněné metodě. Průtok byl zachován na 1 ml/min a za kolonou by rozdělen tak, aby 0,2 ml/min proudilo do MS detektoru. Nečistoty byly dále identifikovány pomocí NMR spekter (¹H, ¹³C) a IČ spekter.¹⁴

V roce 2015 vyšel také článek o nově vyvinuté a zvalidované metodě stanovení vortioxetinu v plasmě krysy s carbamazepinem jako interním standardem. Pro stanovení byl použit systém UPLC-MS/MS. Podařilo se vyvinout postup jak detekovat vortioxetin už v 0,1 ml krysí plasmy. Pro měření byla použita kolona C18 (2,1 mm × 50 mm × 1,7 μm). Byla použita mobilní fáze složka A - acetonitril a složka B - 0,1% mravenčí kyselina s třiminutovým gradientem v rozsahu 20-95 % složky A. Pro trojitý kvadrupól byla použita ESI ionizace. Detekce byla provedena v režimu monitorování vybraných reakcí (MRM), kde MRM přechod byl pro vortioxetin z m/z 299,2 na 150,0 a pro interní standard z m/z 237,1 na 194,2.

LOQ bylo určeno na dolní hladině kalibračního rozsahu 0,05 ng/ml. Přesnost metody byla vyhodnocena jako RSD a to nižší než 8,5 % u všech koncentrací a správnost metody byla vyhodnocena jako relativní směrodatná odchylka (RSD), která se pohybovala mezi -11,2 a 9,5 %. Hodnota výtěžnosti u kontrolních vzorků byla mezi 78,3 a 88,4% a u interního standardu 80,3 %. Byla provedena také zkouška stability v plasmě a to na pěti vzorcích na třech koncentračních hladinách při různých podmínkách. Jako krátkodobé testy stability byly měřeny: vzorky se standardním přídatkem při laboratorní teplotě po dobu 3 hodin, vzorky připravené k nastříknutí v autosampleru při 4 °C po dobu 4 hodin, stabilita po třikrát opakovaném zmrazení a rozmrazení v následujících dnech a jako dlouhodobý test stability byly změřeny vzorky se standardním přídatkem při -20 °C po dobu 49 dní. U všech stabilitních vzorků se RSD pohybovala pod 15 % a neprojevila se žádná významná degradace.

Tato metoda byla úspěšně použita pro účely farmakokinetické studie orálně podávaného vortioxetinu na kryších.¹⁵

Dále byla v roce 2016 publikována práce, kde byla popsána opět metoda stanovení vortioxetinu v plasmě kryš, ale zde spolu se stanovením carvedilolu, látky užívané jako lék na vysoký krevní tlak a srdeční potíže a 4-hydroxyfenylcarvedilolu, jeho metabolitu. Tato metoda je velice podobná metodě výše zmíněné.

Stanovení bylo provedeno na systému UPLC-MS/MS s použitím diazepamů jako interního standardu. Byla použita kolona C18 (2,1 mm × 50 mm × 1,7 μm) a gradientová eluce se složkou A acetonitrilem a složkou B 0,1% kyselinou mravenčí ve vodě v rozsahu 95 až 10 % složky A. Detekce byla provedena za použití trojitého kvadrupólu v režimu monitorování vybraných reakcí (MRM), kde MRM přechod byl pro vortioxetin z m/z 299,2 na 150,1, pro carvedilol z m/z 407,2 na 100,3, pro 4-hydroxyfenyl carvedilol z m/z 423,2 na 100,1 a pro diazepam z m/z 285,2 na 193,1 s použitím pozitivního módu ESI ionizace. Metoda byla zvalidována v koncentračním rozsahu 0,5 – 100 ng/ml pro vortioxetin a celkový čas analýzy byl 3,0 min.

Byla testována přesnost a správnost v rámci jednoho i více dnů na vzorcích o třech různých koncentracích s výsledky relativní směrodatné odchylky do 11,6 % a správnost mezi -12,2 % a 11,3 %.

Dále byl proveden test stability opět podobně jako u výše zmíněné metody. Byly změřeny vzorky, které stály 2 hodiny při laboratorní teplotě, 24 hodin v autosampleru při 4 °C, 35 dnů při -20 °C a které podstoupily trojnásobné rozmrazení a zmrazení z -20 °C na 20 °C. Z naměřených dat bylo ukázáno, že stabilita je dostatečná, tedy byla naměřena koncentrace 85–115% oproti původní.

Díky této metodě bylo ve farmakokinetické studii prokázáno, že současné podávání vortioxetinu a carvedilolu má výrazný vliv na jejich toxikokinetiku.¹⁸

2.2. Kapilární elektroforéza v nevodném prostředí

V kapilární elektroforéze jsou látky separovány v elektrickém poli. Mají-li dvě látky stejnou elektroforetickou pohyblivost a nelze je pomocí CZE oddělit, používají se různé modifikace jako přidání látky pro tvorbu komplexu do základního elektrolytu či použití pseudostacionární fáze (MECK)^{27, 28}. Jednou z možných modifikací je kapilární elektroforéza v nevodném prostředí (NACE)^{24, 25}, kdy je jako základní elektrolyt použit pufr v organickém rozpouštědle. Nejčastěji využívanými organickými solventy je methanol, acetonitril a jejich kombinace.

Důvodem pro použití NACE může být například lepší rozpustnost stanovované látky v nevodném rozpouštědle. Další výhodou nevodného prostředí v kapilární elektroforéze je nižší elektrický proud, díky čemuž není problém se vznikem Joulova tepla. Je tak možné aplikovat vysoké napětí na kratší kapiláry a zvýšit tak efektivitu separace. Nevodná rozpouštědla jsou také dobře kompatibilní s detektory používanými ve spojení s kapilární elektroforézou jako UV detektor, fluorescenční detektor, elektrochemický detektor či hmotnostní spektrometr.^{24, 25} Nevodné prostřední ovlivňuje vlastnosti analytů a někdy je tak možné docílit lepší citlivosti detektoru.²⁶

2.3. Studie stability léčivých přípravků

Stabilita léčivého přípravku znamená schopnost zachovat si za daných podmínek po určitou dobu určené jakostní znaky. Stabilitní studie je pak soubor testů, které mají za cíl dokumentovat změny v kvalitě testovaného produktu působením vnějších vlivů. Důsledkem případné nestability léku může být změna koncentrace léčiva, změna biologické dostupnosti, ztráta mikrobiologické nezávadnosti, vznik rozkladných produktů či změna vzhledu lékové formy.

2.3.1. Způsoby testování

Pro testování stability se využívají organoleptické hodnocení (sledování vzhledu, zápachu, barvy, chuti a podobně), fyzikální zkoušky (např. sledování vzniku sraženiny či zákalu v roztoku, rozřepatelnost sedimentu, u tablety disoluční profil, obsah vlhkosti), chemické zkoušky (sledování vzniku rozkladných produktů, které vznikají především oxidací,

hydrolyzou a vlivem světla), biologické zkoušky a mikrobiologické zkoušky (zkouška mikrobiologické nezávadnosti, zkouška sterility, zkouška nepřítomnosti pyrogenů, zkouška na bakteriální endotoxiny, zkouška na biologickou účinnost heparinu a podobně).

Jako první je potřeba vypracovat plán stabilitní studie, který definuje cíl, účel, rozsah a podmínky zkoušení (vzorky, skladovací podmínky, dobu trvání, výběr sledovaných parametrů a jejich limity, testovací metody, referenční materiál). Všechny testovací analytické metody musí být validovány.

2.3.2. Typy stabilitních testů

Stabilitní testy se dělí podle podmínek zátěže na stresové testy, zrychlené testy a dlouhodobé testy.

Během stresových testů je přípravek podroben extrémní fyzikální a chemické zátěži za účelem urychlení chemického rozkladu léčiva, případně antioxidantů nebo konzervačních látek nebo za účelem fyzikální změny přípravku. Cílem testu je určit základní vlastnosti substance nebo produktu v situacích simulujících extrémní podmínky výroby, skladování, transportu a působení vnějších vlivů, identifikovat a charakterizovat degradační produkty a dále ověřit vhodnost metod pro analýzu rozkladných produktů. Během testů se zpravidla zjišťuje vliv zvýšené teploty, účinek světla, vliv pH, vliv oxidace, kompatibilita účinné látky s pomocnými látkami a s obalem a vliv vlhkosti. Doba trvání stresového testu bývá nejvýše tři měsíce.

Zrychlený test je část stabilitní studie prováděná za extrémních skladovacích podmínek za účelem urychlení chemického rozkladu nebo fyzikální změny léčivého přípravku. Výsledky ze zrychlených testů se mohou použít k výběru vhodné technologie, konečného složení přípravku a definování skladovacích podmínek. Pokud generický přípravek vyhoví požadavkům během zrychleného testu, je možno stanovit dobu použitelnosti na dva roky při normálních podmínkách. Studie trvá šest měsíců.

Dlouhodobé testy se provádějí za doporučených podmínek skladování pro určení doby použitelnosti. V úvahu se bere, do kterého klimatického pásma země patří podle rozdělení Světové zdravotnické organizace. Pásma byla utvořena na základě průměrně dosahovaných teplot a vlhkosti vzduchu. Přípravky se testují v originálním uzavřeném obalu.

Když už je přípravek v prodeji, probíhají takzvané následné stabilitní zkoušky. Jedná se o dlouhodobé testování, které si zajišťuje výrobce u vybraných šarží za účelem neustálého sledování kvality výroby, kvality surovin, kvality obalového materiálu a podobně. Zkoušky se obvykle konají na počátku, pak po půl roce, roce a dvou letech.

V případě jakékoli změny ve výrobě či složení je nutno provést změnové stabilitní zkoušky. Rozsah těchto zkoušek záleží na závažnosti změn a na výsledcích z předchozích stabilitních studií.

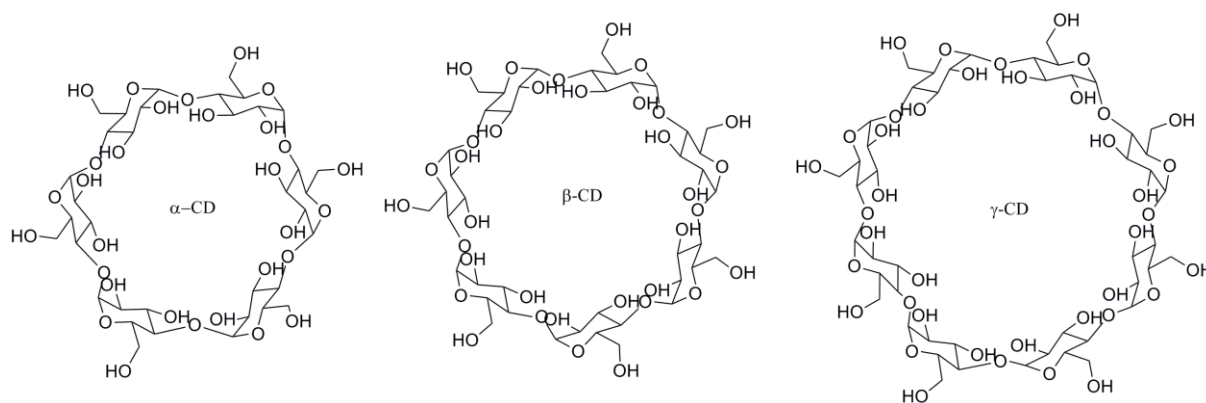
Dalším typem je takzvaná in-use studie, která má za cíl ověřit stabilitu léčiva v multidávkovém balení po otevření. Stává se totiž, že dokud je léčivo uzavřeno v obalu, zůstává stabilní, po prvním otevření se však mohou projevit známky nestability či může dojít k mikrobiální kontaminaci.⁷

2.4. Cyklodextriny

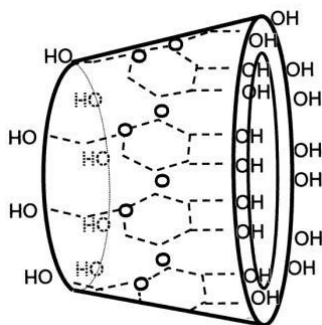
2.4.1. Vlastnosti cyklodextrinů

Cyklodextriny (CD) (viz O

obr. 2) jsou cyklické oligosacharidy složené z šesti (α -CD), sedmi (β -CD), osmi (γ -CD) či více glukózových jednotek a jsou produktem rozkladu škrobu. Poprvé byly popsány A. Villiersem v roce 1891, jejich struktura však byla objasněna až roku 1942 pomocí rentgenové krystalografie.¹⁰ Cyklodextriny mají tvar prstence, jehož vnitřní prostor má hydrofóbní charakter a vnější prostor hydrofilní charakter (viz obr. 3).



Obrázek 2 Struktura α -cyklodextrinu, β -cyklodextrinu a γ -cyklodextrinu⁸



Obrázek 3 Schematické znázornění prostorového uspořádání cyklodextrinů⁹

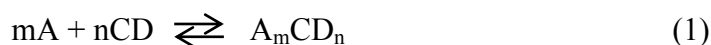
2.4.2. Využití cyklodextrinů

Jedním z hlavních využití cyklodextrinu je tvorba inkluzního komplexu s hydrofóbní látkou. Lze tak zlepšit vlastnosti hostující látky jako je její rozpustnost, odolnost proti degradaci oxidací, zářením či teplotou, kontrola těkavosti, chromatografická separace, kontrola uvolnění účinné látky z léku a v neposlední řadě zamaskování chuti účinné látky a usnadnění tak pacientům užívání léku. Cyklodextriny se využívají v potravinářství, farmacii, kosmetickém průmyslu a při ochraně životního prostředí. Například v potravinářství se využívají k zachování chuti, jelikož většina přírodních i umělých látek udávajících chuť je těkává, komplexace těchto látek s cyklodextriny tak chuť udrží. Ve farmacii jsou pak hlavními důvody zvýšení hydrofilicity dané látky, například pro průchod biologickou membránou a doručení účinné látky na správné místo a zamaskování chuti účinné látky.

Kromě nativních cyklodextrinů byly nasyntetizovány také jejich deriváty například aminací či esterifikací. V závislosti na substituentu se můžou změnit vlastnosti výsledného derivátu jako objem hydrofóbní kavity, případně rozpustnost či stabilita. Modifikované cyklodextriny se využívají například pro cílený transport účinné látky, vykazují také větší enantiosektivitu než nativní cyklodextriny, čehož lze využít v analytické chemii.

Inkluzní komplex vzniká mezi cyklodextrinem a vhodně velkou hydrofóbní látkou, uplatňují se zde různé nekovalentní interakce jako van der Waalsovy síly, hydrofóbní interakce a další. Tato komplexace je prováděna většinou ve vodném prostředí, ale možná je i v částečně vodném či nevodném prostředí. Kvůli velikosti kavity váže α -CD menší molekuly nebo molekuly s alifatickým postranním řetězcem, β -CD aromatické a heterocyklické látky a γ -CD komplexuje větší molekuly, jako jsou například steroidy. Při tvorbě inkluzního komplexu jsou molekuly vody uvnitř kavity nahrazeny více hydrofóbní látkou obsaženou v roztoku, čímž vznikne energeticky výhodnější stav. Navázání takzvané hostující molekuly

A dovnitř cyklodextrinu CD není trvalé, jde o dynamickou rovnováhu, která je popsána rovnicemi 1, 2 a 2',



$$\beta = \frac{a_{(A_mCD_n)}}{a_{(A)}^m a_{(CD)}^n} \quad (2)$$

$$\beta' = \frac{[A_mCD_n]}{[A]^m [CD]^n} \quad (2')$$

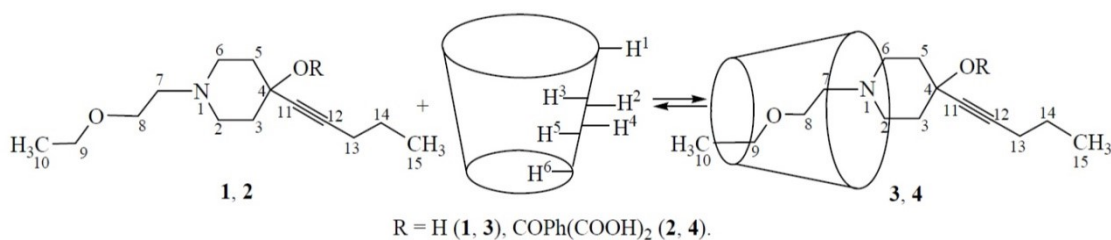
kde β je rovnovážná konstanta, β' je zdánlivá rovnovážná konstanta a $[A_mCD_n]$, $[A]$, $[CD]$ jsou molární koncentrace komplexu, hostující molekuly a cyklodextrinu.

Většinou se u těchto reakcí jedná o stechiometrii 1:1, není to však podmínkou. V zásadě stačí, aby část molekuly vhodně odpovídala tvaru kavity a komplexace proběhne. Může tak nastat situace, kdy jedna molekula cyklodextrinu bude interagovat s více hostujícími molekulami, ale i situace, kdy s jednou větší hostující molekulou bude interagovat více molekul cyklodextrinu.

Stabilitu inkluzního komplexu samozřejmě ovlivňuje teplota. Vyšší teplota může zvýšit rozpustnost komplexu, ale zároveň může způsobit nestabilitu, tyto dva efekty je tedy třeba vhodně vyvážit. Většina komplexů s cyklodextriny se rozpadá při teplotě okolo 50-60 °C.¹⁰

2.4.3. Konkrétní příklady využití cyklodextrinů

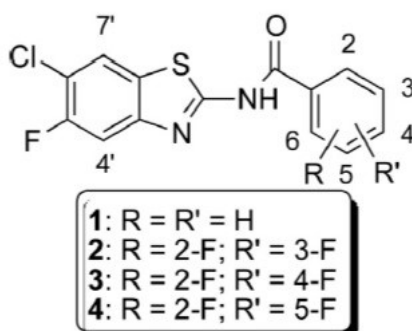
Jak bylo zmíněno výše, cyklodextriny dokáží tvorbou inkluzního komplexu s aktivní látkou zlepšit její vlastnosti jako rozpustnost či odolnost proti degradaci. Z těchto důvodů byl například v nedávné době využit β -cyklodextrin pro tvorbu inkluzního komplexu s biologicky aktivními látkami 1-(2-ethoxyethyl)-4-(pentyn-1-yl)-4-hydroxypiperidinem a 1-(2-ethoxyethyl)-4-(pentyn-1-yl)-4-benzoyloxypiperidinem. Z dat naměřených na NMR bylo potvrzena tvorba komplexu (viz obr. 4).¹¹



Obrázek 4 Tvorba komplexu β -cyklodextrinu s 1-(2-Ethoxyethyl)-4-(pentyn-1-yl)-4-hydroxypiperidinem (1) a 1-(2-Ethoxyethyl)-4-(pentyn-1-yl)-4-benzoyloxypiperidinem (2)¹¹

Dalším příkladem využití tvorby inkluzního komplexu s β -cyklodextrinem v nedávné době je tvorba komplexu s 2-(benzothiazolyl-2')azino-5-aryliden-4-thiazolidinonem. Tato látka byla syntetizována a zkoumány byly její potencionální antibakteriální účinky. Komplexace s β -cyklodextrinem byla provedena pro dosažení větší rozpustnosti. Testování antibakteriálních účinků bylo provedeno na bakteriích *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* takzvanou „cap plate“ metodou. Výsledky ukázaly, že inkluzní komplex s β -cyklodextrinem prokazuje kromě lepší rozpustnosti i větší antibakteriální aktivitu než původní sloučenina sama o sobě.¹²

Z podobných důvodů byly zkoumány inkluzní komplexy fluoro-substituovaného *N*-benzoyl-2-aminobenzothiazolu (viz obr. 5), který má antibakteriální účinky.



Obrázek 5 Chemická struktura fluoro-substituovaného *N*-benzoyl-2-aminobenzothiazolu 1–4

Z výsledků testů na grampozitivních a gramnegativních bakteriích bylo jasné vidět, že u inkluzního komplexu těchto sloučenin s β -cyklodextrinem a hydroxypropyl- β -cyklodextrinem byla opět pozorována větší rozpustnost a zároveň lepší antibakteriální účinky.¹³

2.5. Stanovení konstanty stability supramolekulárních komplexů cyklodextrinů

Rozlišují se dva hlavní druhy komplexů, první je tvořen interakcí kovu s ligandem, druhý je supramolekulární komplex tvořený nekovalentními interakcemi jako vodíkové můstky, hydrofóbní interakce, van der Waalsovy síly, π - π interakce a elektrostatické síly. Příkladem druhého typu je tzv. „host-guest“ komplex cyklodextrinu s vhodně velkou hydrofóbní látkou.

Konstantou stability komplexu se rozumí rovnovážná konstanta tvorby komplexu v roztoku.



$$\beta = \frac{[A_a B_b]}{[A]^a [CD]^b} \quad (4)$$

Inkluzní komplexy aktivních látek s cyklodextriny se ve farmacii využívají již řadu let. Aby se dalo určit, který typ cyklodextrinu je pro danou aktivní látku nejvhodnější, bylo vyvinuto několik metod, jak určit konstantu stability komplexu jako výpočet pomocí naměření fázového diagramu rozpustnosti, měření prostupnosti na hydrofilní permeační membráně a také měření využívající kapilární elektroforézu.¹⁹ Kapilární elektroforéza byla například již v roce 1997 využita pro měření stability komplexu nikotinu s β -cyklodextrinem²⁰, dále například pro určení konstanty stability komplexu syntetického antibiotika ofloxacinu s cyklodextriny²¹, komplexu derivátů betulinu s β -cyklodextrinem²², či komplexu lokálního anestetika prokainu s β -cyklodextrinem²³.

Podmínkou pro určení konstanty stability komplexu pomocí kapilární elektroforézy je, aby měly látky tvořící komplex dostatečně rozdílné elektroforetické mobility. Dále bude postup objasněn na konkrétním příkladu tvorby supramolekulárního komplexu cyklodextrinu s vortioxetinem. Vortioxetin je v kyselém základním elektrolytu kladně nabitý, na rozdíl od cyklodextrinu, který je neutrální. Nejprve je potřeba zjistit hodnotu efektivní elektroforetické mobility pouze vortioxetinu ($\mu_{\text{vort,ef}}$). Dále se provede série měření, kdy se do základního elektrolytu přidává cyklodextrin postupně o různých koncentracích. Pokud spolu látky komplex tvoří, bude to patrné na změně hodnoty efektivní elektroforetické mobility

vortioxetinu. Tvorba komplexu není jednosměrná reakce, ale jde o dynamický proces. Pokud tedy dochází k tvorbě komplexu, po přidání cyklodextrinu do základního elektrolytu je naměřená hodnota efektivní elektroforetické mobility vortioxetinu tvořena lineární kombinací mobility vortioxetinu ($\mu_{vort,ef}$) a mobility komplexu ($\mu_{komplex,ef}$) a to v poměru daném jejich rovnovážnými koncentracemi a tedy konstantou stability.

$$\mu = \mu_{vort,ef} \frac{[vort]}{c_{vort}} + \mu_{komplex,ef} \frac{[komplex]}{c_{vort}} \quad (5)$$

Kde $\mu_{vort,ef}$ je efektivní elektroforetická mobilita vortioxetinu, $\mu_{komplex,ef}$ efektivní elektroforetická mobilita komplexu vortioxetinu s cyklodextrinem, $[vort]$ rovnovážná koncentrace vortioxetinu, $[komplex]$ rovnovážná koncentrace komplexu vortioxetinu s cyklodextrinem a c_{vort} celková koncentrace vortioxetinu.

Dále pro tento komplex platí následující vzorec pro konstantu stability,

$$\beta = \frac{[komplex]}{[vort][CD]} \quad (6)$$

který lze upravit na tvar

$$[vort] = \frac{[komplex]}{\beta[CD]} \quad (7)$$

Kde $[vort]$ je rovnovážná koncentrace vortioxetinu, $[komplex]$ rovnovážná koncentrace komplexu vortioxetinu s cyklodextrinem a $[CD]$ rovnovážná koncentrace cyklodextrinu.

Platí také, že rovnovážná koncentrace komplexu se rovná celkové koncentraci vortioxetinu v roztoku ponížené o rovnovážnou koncentraci volného vortioxetinu v roztoku.

$$[komplex] = c_{vort} - [vort] \quad (8)$$

Dosazením vztahů (7) a (8) do rovnice (5) tak lze získat vztah

$$\mu = \mu_{vort,ef} \frac{[komplex]}{\beta[CD]c_{vort}} + \mu_{komplex,ef} \frac{c_{vort} - [vort]}{c_{vort}} \quad (9)$$

Dalšími úpravami (9) za pomoci vztahů (6) a (8) lze získat požadovaný tvar

$$\mu = \mu_{vort,ef} \frac{1}{\beta [CD]+1} + \mu_{komplex,ef} \left(1 - \frac{1}{\beta [CD]+1}\right) \quad (10)$$

V této rovnici tedy známe μ (aktuální naměřená hodnota efektivní elektroforetické mobility), $\mu_{vort,ef}$ (efektivní elektroforetická mobilita čistého vortioxetinu) a $[CD]$ (rovnovážná koncentrace cyklodextrinu, která je s malým zanedbáním rovna původní koncentraci v základním elektrolytu). Za použití funkce Řešitel v programu MS Excel lze nechat spočítat hodnoty $\mu_{komplex,ef}$ (efektivní elektroforetická mobilita pouze komplexu) a β (konstanta stability) tak, aby byla co nejmenší suma čtverců rozdílů naměřených hodnot efektivní mobility vortioxetinu a hodnot vypočtených podle rovnice (10). Křivka vykreslená podle rovnice (10) s takto vypočtenými hodnotami by ideálně měla protínat body naměřených hodnot.

3. Experimentální část

3.1. Použité přístroje a chemikálie

Pro měření jsem používala kapilární elektroforézu s UV detektorem (Agilent 1600 CE, USA) s kapilárou dlouhou 50 cm s efektivní délkou 41,5 cm, vnitřním průměrem 75 μm a vnějším průměrem 375 μm (Microsolv technology corporation, USA). Pro vyhodnocení jsem používala program 3D-CE Chemstation (Rev.B.02.01-SR2[260]). Po vložení kapiláry do přístroje jsem ji vždy promývala nejprve 5 min 1M NaOH a poté 10 min vodou. Před vyjmutí kapiláry z přístroje po skončení měření jsem ji promývala 10 min 1M NaOH a 20 min vodou.

Pro měření jsem použila chemikálie: kyselina mravenčí (98-100% Merck, Německo), hydroxid sodný ($\geq 98\%$, Penta, ČR), vortioxetin (99,36 % dodáno společností Zentiva, ČR), α -CD ($\geq 98\%$, Fluka, USA), γ -CD ($\geq 98\%$, Fluka, USA), thiokyanatan draselný ($\geq 99,0\%$, Lachema, ČR), methanol (99,8 %), β -CD, thiomočovina (99 %), mravenčan amonný (97 %), mannitol ($\geq 98\%$), avicel, hydroxypropyl celuloza (99 %), sodná sůl karboxymethlyškrobu, stearát hořečnatý, methocel, macrogol 6000, oxid titaničitý (99,99 %), oxid železitý ($\geq 99,995\%$)(Sigma-Aldrich, USA)

Během práce jsem použila přístroje: ultrazvuková lázeň (Elmasonic S15, Snr 100808125, Německo), pH metr (P-lab, 3540 pH&conductivity Meter, ČR), analytické váhy (Precisa Instrument AGDietkon-CH, výrobní č. N56763, USA), spektrometr (Agilent Technologies (8453), Waldbronn, USA), stabilitní komora (Mettler Humidity Chamber HCP, Německo).

3.2. Určení stability supramolekulárního komplexu vortioxetinu s cyklodextrinem

3.2.1. Podmínky měření

Jako základní elektrolyt (BGE) jsem použila mravenčanový pufr o pH = 3,50. Připraven byl z 50mM roztoku HCOOH a dotitrováním 1M NaOH na dané pH. Zásobní roztok vortioxetinu jsem si připravila o koncentraci 1 mg/ml hydrobromidové soli vortioxetinu rozpuštěním navážky v methanolu. Jako marker elektroosmotického toku jsem používala thiomočovinu dávkovanou spolu se vzorkem. Zásobní roztok thiomočoviny jsem si připravila o koncentraci 1 mg/mL ve vodě. Do vialky pro měření jsem pak ředila připravený roztok vortioxetinu i thiomočoviny základním elektrolytem na koncentraci 0,1 mg/ml. Zásobní roztok cyklodextrinů (α -CD, β -CD, γ -CD) jsem připravila o koncentraci 10 mmol/l rozpuštěním v základním elektrolytu. Pro měření s přidavkem cyklodextrinu v základním elektrolytu jsem ředila zásobní roztok cyklodextrinu základním elektrolytem na požadovanou

koncentraci. Před každým novým měřením jsem nastavila prekondicionaci kapiláry a to proplach z vialky se základním elektrolytem do odpadu po dobu 1 min a následně z vialky se základním elektrolytem do vialky se základním elektrolytem po dobu 1 min. Podmínky měření jsou shrnuty v následující tabulce (Tabulka 1).

Tabulka 1 Podmínky měření při sledování interakce vortioxetinu s cyklodextrinem

promývání	BGE → odpad (1 min, 93 kPa) BGE → BGE (1 min, 93 kPa)
dávkování	3 s, 5 kPa
vložené napětí	30 kV
procházející proud	70 μ A
teplota	25°C
doba analýzy	20 min
vlnová délka detekce	200 nm
vnitřní průměr kapiláry	75 μ m
délka kapiláry	50,0 cm
efektivní délka kapiláry	41,5 cm

3.2.2. Provedená měření

Pro určení interakce vortioxetinu s cyklodextrinem jsem do základního elektrolytu přidávala cyklodextrin o různých koncentracích. Každé měření jsem provedla třikrát. Z naměřených migračních časů vortioxetinu a thiomocoviny jsem spočítala efektivní elektroforetickou mobilitu vortioxetinu (viz Rovnice 11) a pro další vyhodnocení jsem použila medián této efektivní mobility.

$$\mu_{vort,ef} = \frac{l_{det}-l_{kapilara}}{t_{vort} \cdot U} - \frac{l_{det}-l_{kapilara}}{t_{TM} \cdot U} \quad (11)$$

$\mu_{vort,ef}$ – efektivní elektroforetická mobilita vortioxetinu, l_{det} – délka od konce kapiláry k okénku pro detektor, $l_{kapilara}$ – celková délka kapiláry, t_{vort} – migrační čas vortioxetinu, t_{TM} – migrační čas thiomocoviny, U – vložené napětí

Měření jsem provedla s α , β a γ cyklodextrinem. Daný cyklodextrin jsem přidávala do základního elektrolytu až do koncentrace 10 mmol/l. U měření s γ -CD jsem přidávala cyklodextrin pouze do koncentrace 4 mmol/l, jelikož při vyšších koncentracích γ -CD v základním elektrolytu byl pík i při opakovaném měření rozštěpený a hodnota migračního času se nedala spolehlivě odečíst. Z naměřených dat jsem vypočítala hodnotu konstanty stability vznikajícího komplexu. Pro výpočet jsem použila postup vysvětlený v kapitole 2.5. Vypočítala jsem teoretické hodnoty efektivní elektroforetické mobility vortioxetinu při daných koncentracích CD v základním elektrolytu dle odvozené rovnice (10). Za rovnovážnou koncentrací CD ($[CD]$) jsem dosadila koncentraci CD v základním elektrolytu (0; 0,2; 0,4; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 mmol/l), za efektivní elektroforetickou mobilitu samotného vortioxetinu ($\mu_{\text{vort,ef}}$) jsem dosadila hodnotu zjištěnou z měření bez přídavku CD do základního elektrolytu $2,43 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \text{s}^{-1} \text{V}^{-1}$. Metodou nejmenší sumy čtverců rozdílů naměřených a vypočtených hodnot $\mu_{\text{vort,ef}}$ jsem s použitím funkce Řešitel v programu MS Excel spočítala hodnotu efektivní elektroforetické mobility samotného komplexu $\mu_{\text{komplex,ef}}$ a hodnotu konstanty stability komplexu β . Spočítala jsem koeficient determinace proložení naměřených hodnot odvozenou rovnicí $10 R^2$ podle vzorce

$$R^2 = 1 - \frac{S_e}{S_t} \quad (12)$$

kde S_e je suma čtverců naměřených hodnot y od vypočtených hodnot y a S_t je suma čtverců odchylek naměřených hodnot y od průměrné hodnoty y . Kromě použití odvození z kapitoly 2.5, které předpokládá interakci cyklodextrinu a vortioxetinu v poměru 1:1, jsem spočítala obdobným způsobem hodnotu efektivní elektroforetické mobility samotného komplexu $\mu_{\text{komplex,ef}}$, hodnotu konstanty stability komplexu β a hodnotu korelačního koeficientu proložení naměřených hodnot s použitím proložení, které předpokládá interakci cyklodextrinu a vortioxetinu v poměru 2:1.

3.3. Vývoj metody pro stanovení vortioxetinu a její použití pro ověření stability tablety

3.3.1. Podmínky měření

Jako základní elektrolyt jsem použila nevodný methanolvý pufr obsahující 25 mmol/l mravenčanu amonného a 25mmol/l kyseliny mravenčí. U takto připraveného pufru jsem na pH metru změřila $\text{pH}^* = 5,53$ (pH bylo změřeno na pH metru nakalibrovaném na vodné roztoky). Zásobní roztok vortioxetinu jsem si připravila o koncentraci 1 mg/ml hydrobromidové soli vortioxetinu rozpuštěním navážky v methanolu. Jako marker elektroosmotického toku jsem v některých měřeních používala thiomočovinu dávkovanou

spolu se vzorkem. Zásobní roztok thiomocoviny jsem si připravila o koncentraci 1mg/ml ve vodě. Pro optimalizaci metody jsem dávkovala vzorek připravený ze zásobních roztoků vortioxetinu a thiomocoviny jejich naředěním základním elektrolytem na koncentraci 0,1 mg/ml. Pro urychlení metody jsem po celou dobu analýzy aplikovala tlak 2 kPa na vstupní konec kapiláry. Podmínky měření jsou shrnuty v následující tabulce (Tabulka 2).

Tabulka 2 Podmínky měření v metodě pro stanovení vortioxetinu

promývání	BGE → odpad (1 min, 93 kPa) BGE → BGE (1 min, 93 kPa)
dávkování	3 s 5 kPa
vložené napětí	30 kV
procházející proud	70 μ A
vložený tlak na vstupní konec kapiláry	2 kPa
teplota	25°C
doba analýzy	8 min
vlnová délka detekce	200 nm
vnitřní průměr kapiláry	75 μ m
délka kapiláry	50,0 cm
efektivní délka kapiláry	41,5 cm

3.3.2. Zjištění případné interference excipientů

V tabletě s vortioxetinem jako účinnou látkou je obsaženo devět pomocných látek, takzvaných excipientů. Pro ověření, zda nedochází k interferenci těchto látek s píkem vortioxetinu jsem připravila zásobní roztok každého excipientu v methanolu o zamýšlené koncentraci 10 mg/ml. Roztok jsem připravila navážením daného množství excipientu a rozpuštěním v methanolu. U většiny excipientů nedošlo k úplnému rozpuštění ani za použití ultrazvukové lázně po dobu 5 min. Roztoky excipientů, které nebyly čiré, jsem zfiltrovala přes 0,45 μ m diskový polyvinylidenfluoridový (PVDF) filtr. V následující tabulce (Tabulka 3) jsou uvedeny použité excipienty a zda byl jejich zásobní roztok při přípravě filtrován.

Tabulka 3 Tabulka použitých excipientů s údajem, zda byl jejich zásobní roztok při přípravě filtrován

excipient	stav rozpuštění v MeOH
mannitol	filtrace
avicel	filtrace
hydrolosa	rozpuštěno
sodná sůl karboxymethylškrobu	filtrace
stearát hořečnatý	filtrace
methocel	filtrace
makrogol 6000	rozpuštěno
oxid titaničitý	filtrace
oxid železitý	filtrace

Kromě toho jsem si připravila směsný zásobní roztok všech excipientů smícháním stejného množství každého zásobního roztoku jednotlivých excipientů. Každý z takto připravených roztoků excipientů a roztok se všemi excipienty jsem nadávkovala a změřila výše zmíněnou metodou. Zjistila jsem interferenci při měření roztoku železitých iontů. Pro oddělení píku vortioxetinu od interferujícího píku jsem upravila pH základního elektrolytu. Připravila jsem si 55 mM mravenčanový pufr v methanolu rozpuštěním mravenčanu amonného a konc. kyseliny mravenčí v methanolu v molárním poměru kyseliny a soli 1:10 a 10:1. Na pH metru jsem změřila jejich $\text{pH}^* = 4,60$ resp. $\text{pH}^* = 6,42$. Úprava pH neodstranila interferující pík, proto jsem připravila roztok thiokyanatanu draselného o koncentraci 10 mg/ml rozpuštěním navážky v methanolu. Přídavkem thyikianatanu draselného byla interference odstraněna a u dalších měření jsem tak dávkovala roztok pro měření smíchaný s roztokem thiokyanatanu draselného o koncentraci 10 mg/ml v obj. poměru 9:1.

3.3.3. Kalibrační závislost

Pro změření kalibrační závislosti jsem si připravila osm kalibračních roztoků o různé koncentraci. Pro přípravu kalibračních roztoků jsem si namíchala dva zásobní roztoky vortioxetinu v methanolu o koncentraci 1,0 a 0,1 mg/ml. Příprava zásobních roztoků je shrnuta v následující tabulce (Tabulka 4).

Tabulka 4 Údaje pro přípravu zásobních roztoků vortioxetinu v methanolu pro přípravu kalibračních roztoků

	objem	navážka	koncentrace	
	V [ml]	m [mg]	c [mg/ml]	c [mol/L]
zásobní roztok 1	25,00	2,6	0,10	$2,7 \cdot 10^{-4}$
zásobní roztok 2	25,00	24,8	0,99	$2,6 \cdot 10^{-3}$

Kalibrační roztoky jsem připravila tak, že jsem nejprve navážila všechny excipienty na koncentraci 1 mg/ml. Z důvodu neúplného rozpuštění excipientů a filtrace byla výsledná koncentrace samozřejmě nižší než zamýšlená. Dále jsem připipetovala dané množství jednoho ze zásobních roztoků vortioxetinu, roztoky doplnila methanolem na požadovaný objem a přefiltrovala přes 0,45 µm diskový PVDF filtr. Příprava kalibračních roztoků je shrnuta v následující tabulce (Tabulka 5). Připravila jsem také slepý vzorek a to navážením všech excipientů na koncentraci 1 mg/ml, rozpuštěním v methanolu a přefiltrováním přes stejný filtr.

Tabulka 5 Údaje pro přípravu kalibračních roztoků

kalibrační bod číslo	konc. vortioxetinu v použitém zás. roztoku	koncentrace vortioxetinu v kalibračním bodě	
	c [mg/ml]	c [mg/ml]	c [mmol/l]
1	0,10	0,00048	0,0013
2	0,10	0,0050	0,013
3	0,10	0,010	0,026
4	0,99	0,050	0,132
5	0,99	0,100	0,264
6	0,99	0,300	0,791
7	0,99	0,500	1,32
8	0,99	1,00	2,64

Výše uvedenou metodou jsem třikrát změřila slepý vzorek a všechny kalibrační body. Vždy jsem dávkovala vzorek připravený smícháním roztoku daného kalibračního bodu a zásobního roztoku thiokyanatanu draselného v obj. poměru 9:1. Pro výpočet limitů detekce a kvantifikace jsem z elektroferogramů odečetla výšky píků vortioxetinu. Z hodnot mediánu výšky píku ze tří měření u prvních čtyř kalibračních bodů jsem sestrojila kalibrační závislost výšky píku vortioxetinu na jeho koncentraci v měřeném vzorku. Dále jsem u tří měření kalibračního roztoku o nejnižší koncentraci pomocí vyhodnocovacího programu určila výšku šumu před a za píkem vortioxetinu. Těchto šest hodnot jsem zprůměrovala a za použití regresní rovnice ze závislosti výšky píku na koncentraci spočítala mez detekce (LOD) jako trojnásobek výšky šumu a mez kvantifikace (LOQ) jako desetinásobek výšky šumu.

S ohledem na limit kvantifikace jsem pro kalibrační závislost plochy píku vortioxetinu na koncentraci použila kalibrační roztoky od druhého bodu. V naměřených elektroferogramech jsem zintegrovala plochu píku vortioxetinu. Pro sestrojení kalibrační závislosti jsem použila medián plochy píku ze tří měření.

3.3.4. Měření kontrolních a stabilitních vzorků

Pro ověření stability vzorku za laboratorní teploty ve formě připraveného roztoku jsem si připravila vzorek UV-A (methanolvý roztok vortioxetinu o koncentraci 0,404 mg/ml) a vzorek UV-B (methanolvý roztok o koncentraci vortioxetinu 0,400 mg/ml a o koncentraci všech excipientů 1 mg/ml před zfiltrováním). Látky jsem rozpustila v methanolu za pomoci ultrazvukové lázně a roztoky přefiltrovala přes 0,45 µm diskový PVDF filtr. Takto připravené vzorky jsem naředila 100× a změřila jejich UV spektrum v rozmezí 200 – 1000 nm hned po připravení a následně za 7 dní, během kterých stály v baňce za laboratorní teploty.

Další vzorky, které jsem použila jako kontrolní pro měření robustnosti a pro měření stability, jsou shrnuty v následující tabulce (Tabulka 6).

Tabulka 6 Tabulka připravených kontrolních vzorků pro měření robustnosti a vzorků pro měření stability

vzorek	$C_{\text{vort.}}$ [mg/ml]	obsahuje	použito pro
A	0,416	vortioxetin + excipienty	kontrolní vzorek, vzorek pro měření robustnosti
B	0,051	vortioxetin + excipienty	kontrolní vzorek
C	0,408	vortioxetin + excipienty	stabilita (10 dní, 40°C, 75 % vlhkosti)
D	0,424	vortioxetin	stabilita (10 dní, 40°C, 75 % vlhkosti)
E	0,396	vortioxetin + excipienty	stabilita (4 dni, 80°C, 75 % vlhkosti)
F	0,376	vortioxetin	stabilita (4 dni, 80°C, 75 % vlhkosti)
G	0,384	vortioxetin + excipienty	stabilita (4 dni, 80°C, 75 % vlhkosti)

Pro ověření kalibrace jsem použila kontrolní vzorek A o koncentraci 0,416 mg/ml vortioxetinu a 1 mg/ml všech excipientů před filtrací. Tento vzorek jsem připravila navážením hydrobromidové soli vortioxetinu a excipientů, rozpuštěním v methanolu za pomoci ultrazvukové lázně a přefiltrováním přes 0,45 μm diskový PVDF filtr. Vzorek jsem dávkovala jako roztok připravený smícháním vzorku pro měření a zásobního roztoku thiokyanatanu draselného v obj. poměru 9:1. Měření jsem provedla desetkrát a vyhodnotila s použitím naměřené kalibrační závislosti. Dále jsem tento vzorek změřila stejným způsobem desetkrát v jiném dnu. Dále jsem si připravila druhý kontrolní vzorek B o nižší koncentraci vortioxetinu 0,051 mg/ml navážením 5,1 mg hydrobromidové soli vortioxetinu a rozpuštěním ve 100 ml methanolu za použití ultrazvukové lázně. Vzorek jsem opět dávkovala jako roztok připravený smícháním vzorku pro měření a zásobního roztoku thiokyanatanu draselného v obj. poměru 9:1. Tento vzorek jsem změřila pětkrát a vyhodnotila.

Poté jsem chtěla ověřit robustnost metody, konkrétně vliv malé změny teploty v separačním prostředí ($\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) a pH^* základního elektrolytu (\pm asi 1 jednotka). Dávkovala jsem opět roztok připravený smícháním vzorku A a zásobního roztoku thiokyanatanu draselného v obj. poměru 9:1. Pro ověření vlivu teploty jsem provedla tři měření vzorku A při teplotě 20 $^{\circ}\text{C}$ a tři měření vzorku A při teplotě 30 $^{\circ}\text{C}$. Pro měření s elektrolytem o jiném pH^* jsem použila pufrы o $\text{pH}^* = 4,60$ a $\text{pH}^* = 6,42$, jejichž přípravu jsem popsala v kapitole 3.2.2. S každým tímto pufrem jako základním elektrolytem jsem provedla tři měření vzorku A.

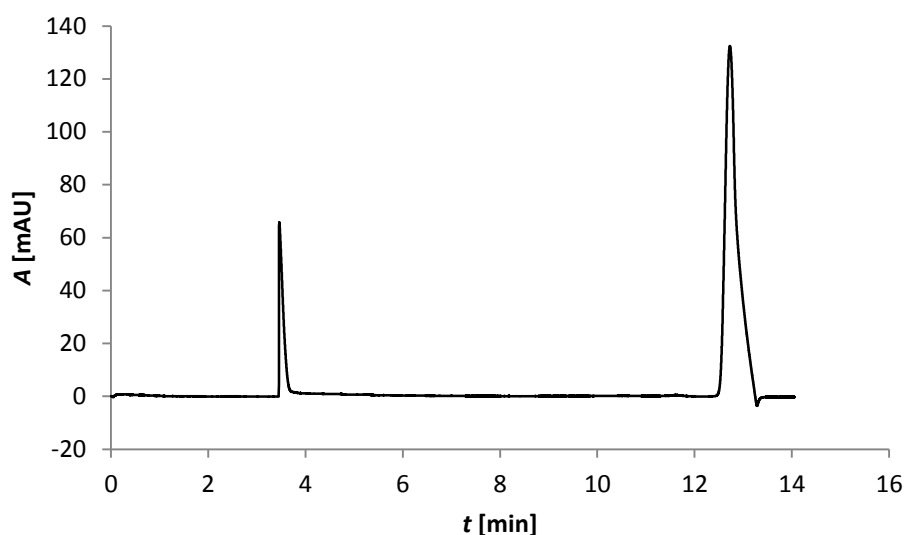
Ověření stability vortioxetinu v tabletě jsem simulovala ověřením stability směsi vortioxetinu se všemi excipienty použitými v tabletě. Připravila jsem si vzorek C o koncentraci 0,408 mg/ml vortioxetinu a 1 mg/ml všech excipientů a vzorek D o koncentraci 0,424 mg/ml vortioxetinu bez excipientů. Vzorky jsem připravila navážením hydrobromidové soli vortioxetinu a excipientů, resp. jen hydrobromidové soli vortioxetinu do odměrné baňky, tu jsem bez zátky umístila do stabilitní komory na 10 dní při 40 °C 75% rel. vlhkosti vzduchu. Po této době jsem baňku vyjmula, obsah za použití ultrazvukové lázně rozpustila v methanolu, doplnila methanolem a zfiltrovala přes 0,45 µm diskový PVDF filtr. Takto připravené vzorky C, D jsem třikrát změřila. Opět jsem dávkovala roztok připravený smícháním vzorku pro měření se zásobním roztokem thiokyanatanu draselného v obj. poměru 9:1.

Stabilitu jsem ověřila ještě v odlišných podmínkách. Připravila jsem si vzorek E o koncentraci 0,396 mg/ml vortioxetinu a 1 mg/ml všech excipientů a vzorek F o koncentraci 0,376 mg/ml vortioxetinu. Vzorky jsem připravila navážením hydrobromidové soli vortioxetinu a excipientů resp. jen hydrobromidové soli vortioxetinu do odměrné baňky, tu jsem bez zátky umístila do stabilitní komory na 4 dni při 80 °C 75% rel. vlhkosti vzduchu. Poté jsem baňku vyjmula, obsah za použití ultrazvukové lázně rozpustila v methanolu, doplnila methanolem a zfiltrovala přes 0,45 µm diskový PVDF filtr. Vzorky E, F jsem třikrát změřila. Opět jsem dávkovala roztok připravený smícháním vzorku pro měření se zásobním roztokem thiokyanatanu draselného v obj. poměru 9:1. Z důvodu ověření správnosti výsledků jsem připravila vzorek G o koncentraci 0,384 mg/ml vortioxetinu a 1 mg/ml všech excipientů. Tento vzorek jsem připravila totožným způsobem jako vzorek E a následně také třikrát změřila.

4. Výsledky a diskuze

4.1. Určení stability supramolekulárního komplexu vortioxetinu s cyklodextrinem

Pro vytvoření supramolekulárního komplexu s vortioxetinem jsem použila nativní cyklodextriny (α -CD, β -CD, γ -CD). S nimi jsem provedla měření popsaná detailně v kapitole 3.1. Pokud vortioxetin tvoří s cyklodextrinem komplex, projevilo by se to po přidavku cyklodextrinu do základního elektrolytu zmenšením naměřené efektivní elektroforetické mobility vortioxetinu ($\mu_{\text{vort,ef}}$). Toto jsem při měření se všemi třemi cyklodextriny skutečně pozorovala. Ukázka získaného elektroferogramu a naměřené hodnoty jsou uvedeny níže (Tabulka 7, 8, 9, obr. 6).



Obrázek 6 Elektroferogram z měření vortioxetinu (první pík) bez přidavku cyklodextrinu s použitím thiomocoviny (druhý pík) jako marker elektroosmotického toku

Tabulka 7 Údaje z měření interakce vortioxetinu s α -CD (ze tři měření jsou uvedeny pouze hodnoty odpovídající mediánu efektivní elektroforetické mobility vortioxetinu)

C_{CD} [mmol/l]	$\mu_{vort,ef}$ [$10^8 m^2 s^{-1} V^{-1}$]	RSD (n=3) [%]
0,0	2,43	0,93
0,2	2,39	1,27
0,4	2,23	1,01
1,0	2,16	2,30
2,0	2,17	1,45
4,0	2,09	1,37
6,0	1,99	2,86
8,0	1,89	1,24
10,0	1,83	1,62

Tabulka 8 Údaje z měření interakce vortioxetinu s β -CD (ze tři měření jsou uvedeny pouze hodnoty odpovídající mediánu efektivní elektroforetické mobility vortioxetinu)

C_{CD} [mmol/l]	$\mu_{vort,ef}$ [$10^8 m^2 s^{-1} V^{-1}$]	RSD (n=3) [%]
0,0	2,43	0,38
0,2	1,85	4,72
0,4	1,67	1,07
1,0	1,34	3,74
2,0	1,23	2,48
4,0	1,12	4,09
6,0	1,11	3,46
8,0	1,08	3,39
10,0	1,01	1,93

Tabulka 9 Údaje z měření interakce vortioxetinu s γ -CD (ze tří měření jsou uvedeny pouze hodnoty odpovídající mediánu efektivní elektroforetické mobility vortioxetinu)

C_{CD} mmol/l	$\mu_{vort,ef}$ $10^8 m^2 s^{-1} V^{-1}$	RSD (n=3) %
0,0	2,43	0,01
0,2	2,11	0,08
0,4	1,99	0,00
1,0	1,76	0,00
2,0	1,54	0,02
4,0	1,25	0,03

Z naměřených dat jsem vynesla do grafu závislost naměřené $\mu_{vort,ef}$ na koncentraci daného cyklodextrinu v základním elektrolytu (obr. 7, 8, 9).

Z grafů je vidět, že se vzrůstající koncentrací daného cyklodextrinu v základním elektrolytu se $\mu_{vort,ef}$ zmenšuje a tedy vortioxetin tvoří komplex se všemi použitými cyklodextriny. Síla interakce se však liší. Při měření s α -CD byl pokles $\mu_{vort,ef}$ poměrně malý (pokles $\mu_{vort,ef}$ o 25%) i při nejvyšší koncentraci α -CD v základním elektrolytu v porovnání s měření s β -CD (pokles $\mu_{vort,ef}$ o 58%). Při měření s γ -CD byl pokles $\mu_{vort,ef}$ opět vyšší než u α -CD (pokles $\mu_{vort,ef}$ o 48%), ale bohužel se podařilo naměřit výsledky pouze do koncentrace 4 mmol/l γ -CD v základním elektrolytu. Při vyšších koncentracích byl pík vortioxetinu rozštěpený a ani při opakovaných měřeních se nepodařilo spolehlivě odečíst migrační čas. Další zvyšování koncentrace γ -CD v základním elektrolytu by pravděpodobně nezpůsobilo výraznější pokles $\mu_{vort,ef}$, nicméně jde pouze o odhad na základě měření s β -CD. Po přidavku β -CD do základního elektrolytu v koncentracích 0 až 1 mmol/l se $\mu_{vort,ef}$ zmenšuje výrazně. Další zvyšování koncentrace β -CD v základním elektrolytu už však výrazný vliv nemá a od koncentrace asi 4 mmol/l β -CD v základním elektrolytu se $\mu_{vort,ef}$ už téměř nemění. Pokud je pokles $\mu_{vort,ef}$ větší, ještě to nutně neznamena větší stabilitu vznikajícího komplexu, jelikož se mohou lišit mobility vznikajících komplexu. Platí však, že čím strměji klesá $\mu_{vort,ef}$ s přidavkem CD do základního elektrolytu, tím je stabilita vznikajícího komplexu větší.

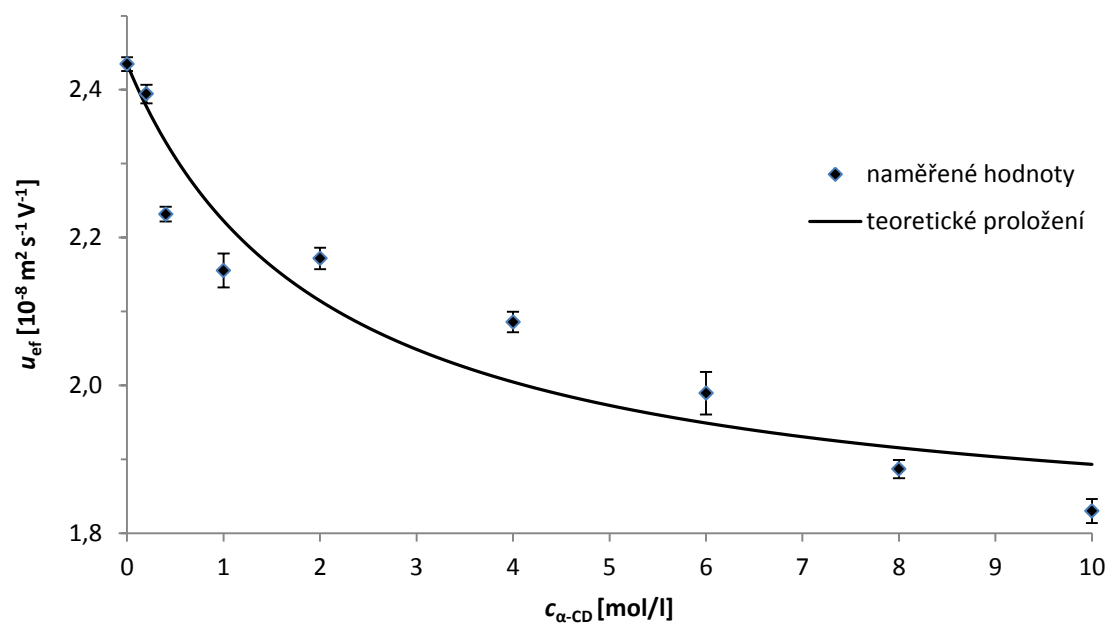
Pro přesné porovnání stability komplexů jsem vypočítala příslušné konstanty stability. Použila jsem postup popsany v kapitole 2.5. S použitím funkce Řešitel v programu MS Excel

jsem tak spočítala dvě neznámé z odvozené rovnice 10, efektivní elektroforetickou mobilitu komplexu vortioxetinu s cyklodextrinem a konstantu stability tohoto komplexu. Tyto hodnoty konstant stability jsou vypočtené na základě proložení naměřených hodnot rovnicí 10, a proto jsem vypočítala také koeficient determinace tohoto proložení (R^2). Vypočtené hodnoty jsou shrnuty v následující tabulce (Tabulka 10).

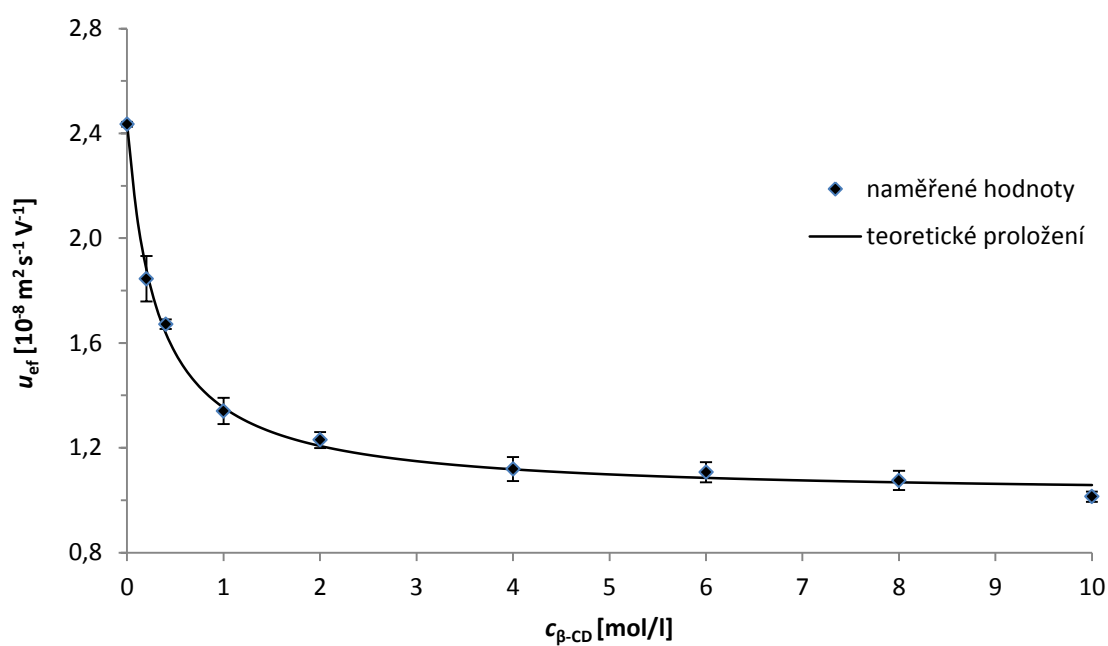
Tabulka 10 Vypočtené hodnoty efektivní elektroforetické mobility komplexu daného cyklodextrinu s vortioxetinem, konstanty stability tohoto komplexu a koeficientu determinace proložení naměřených hodnot $\mu_{\text{komplex,ef}}$ rovnicí 10

	$\mu_{\text{komplex,ef}}$ [$10^8 \text{m}^2 \text{s}^{-1} \text{V}^{-1}$]	β [l/mol]	R^2
α -CD	1,78	479	0,9114
β -CD	1,01	3191	0,9969
γ -CD	1,06	1103	0,9820

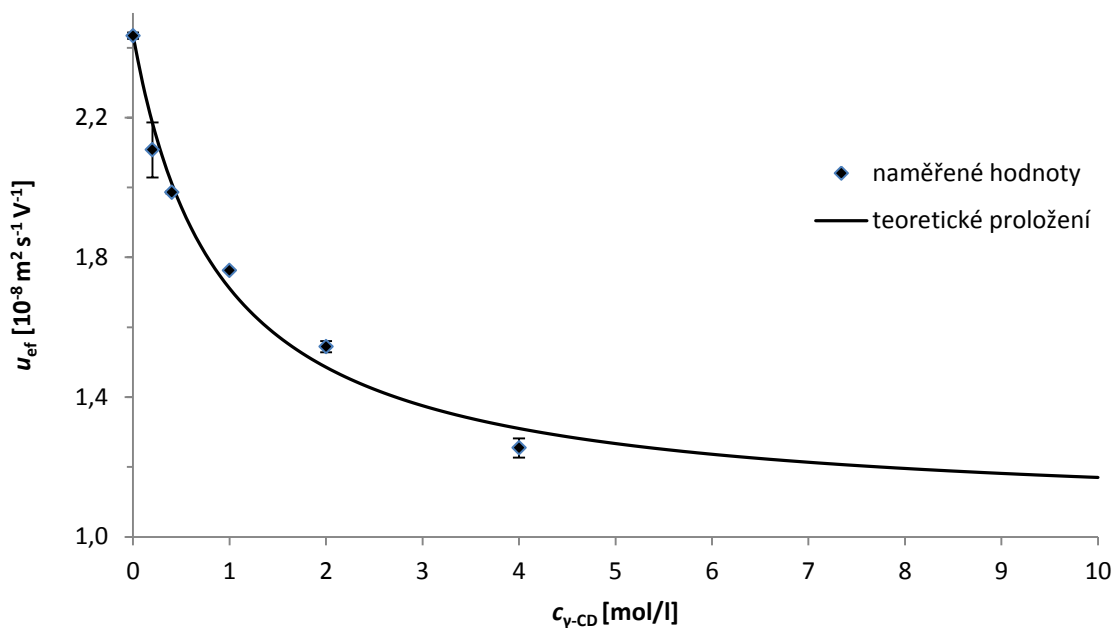
Z vypočtených hodnot konstant stability je zřejmé, že nejvhodnějším z cyklodextrinů pro tvorbu supramolekulárního komplexu s vortioxetinem je β -CD a naopak nejméně vhodný je α -CD.



Obrázek 7 Závislost efektivní elektroforetické mobility vortioxetinu na koncentraci α -CD v základním elektrolytu, uvedeny jsou naměřené hodnoty a teoretické proložení rovnicí 10



Obrázek 8 Závislost efektivní elektroforetické mobility vortioxetinu na koncentraci β -CD v základním elektrolytu, uvedeny jsou naměřené hodnoty a teoretické proložení rovnicí 10



Obrázek 9 Závislost efektivní elektroforetické mobility vortioxetinu na koncentraci γ -CD v základním elektrolytu, uvedeny jsou naměřené hodnoty a teoretické proložení rovnicí 10

Kromě případu, kdy spolu reaguje jedna molekula vortioxetinu a jedna molekula cyklodextrinu, je možné, že stechiometrie reakce je 1:2 či 2:1. Z důvodu malé velikosti α -CD by mohla být zvláště při reakci s tímto cyklodextrinem uplatněna stechiometrie 2:1, tedy reakce dvou molekul cyklodextrinu s jednou molekulou vortioxetinu. Proto jsem kromě výpočtu a proložení podle postupu popsaného v kapitole 2.5, odvodila rovnici (14) analogickým postupem, ale za předpokladu, že s jednou molekulou vortioxetinu interagují dvě molekuly cyklodextrinu. Pro konstantu stability v tomto případě platí

$$\beta = \frac{[\text{komplex}]}{[\text{vort.}] [\text{CD}]^2} \quad (13)$$

a výsledná odvozená rovnice má tvar

$$\mu = \frac{\mu_{\text{vort.}}}{1 + [\text{CD}]^2 \beta} + \mu_{\text{kompl.}} \left(1 - \frac{1}{1 + [\text{CD}]^2 \beta}\right) \quad (14)$$

S použitím funkce Řešitel v programu MS Excel jsem tak spočítala dvě neznámé z odvozené rovnice 14, efektivní elektroforetickou mobilitu komplexu vortioxetinu s cyklodextrinem a konstantu stability tohoto komplexu. Vypočítala jsem také korelační koeficient tohoto proložení (R^2). Vypočtené hodnoty jsou shrnuty v následující tabulce (Tabulka 11).

Tabulka 11 Vypočtené hodnoty efektivní elektroforetické mobility komplexu daného cyklodextrinu s vortioxetinem (v poměru 2:1), konstanty stability tohoto komplexu a koeficientu determinace proložení naměřených hodnot $\mu_{\text{komplex,ef}}$ rovnicí 14

	$\mu_{\text{komplex,ef}}$ [$10^8 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$]	β [l/mol]	R^2
α -CD	1,95	1 163 677	0,8019
β -CD	1,13	12 600 234	0,9599
γ -CD	1,42	4 699 627	0,8955

Po spočítání hodnot se ukázalo, že koeficient determinace proložení naměřených hodnot rovnicí 14 je pro měření s každým typem cyklodextrinu výrazně nižší než při proložení rovnicí 10. Získané hodnoty konstant stability jsou také nereálně vysoké. Pro všechny tři cyklodextriny tedy více odpovídá předpoklad, že spolu intraguje jedna molekula cyklodextrinu s jednou molekulou vortioxetinu.

4.2. Vývoj metody pro stanovení vortioxetinu a její použití pro ověření stability tablety

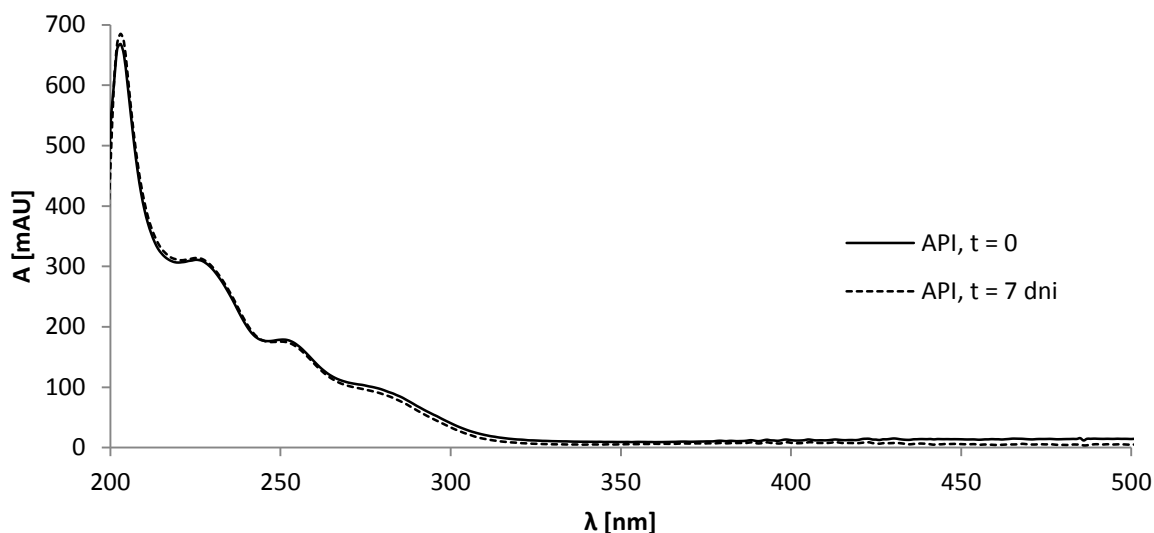
4.2.1. Vývoj metody a naměření kalibrační závislosti

Metodu pro stanovení vortioxetinu jsem se rozhodla vyvinout v nevodném methanolovém prostředí z důvodu větší rozpustnosti vortioxetinu v methanolu než ve vodě. Použila jsem tedy methanolový pufr o $\text{pH}^* = 5,53$. Nejprve jsem změřila vzorek obsahující vortioxetin a thiomocovinu jako marker elektroosmotického toku pouze s vloženým napětím 30 kV po celou dobu analýzy. Na elektroferogramu by bylo vhodné vidět i marker elektroosmotického toku, aby se případně dala spočítat efektivní mobilita analytu. Jelikož však thiomocovina nebyla vidět ani ve 30. minutě, rozhodla jsem se aplikovat také tlak 2 kPa na vstupní konec kapiláry po celou dobu analýzy. Po této úpravě byl migrační čas neutrálních látek okolo 4 min.

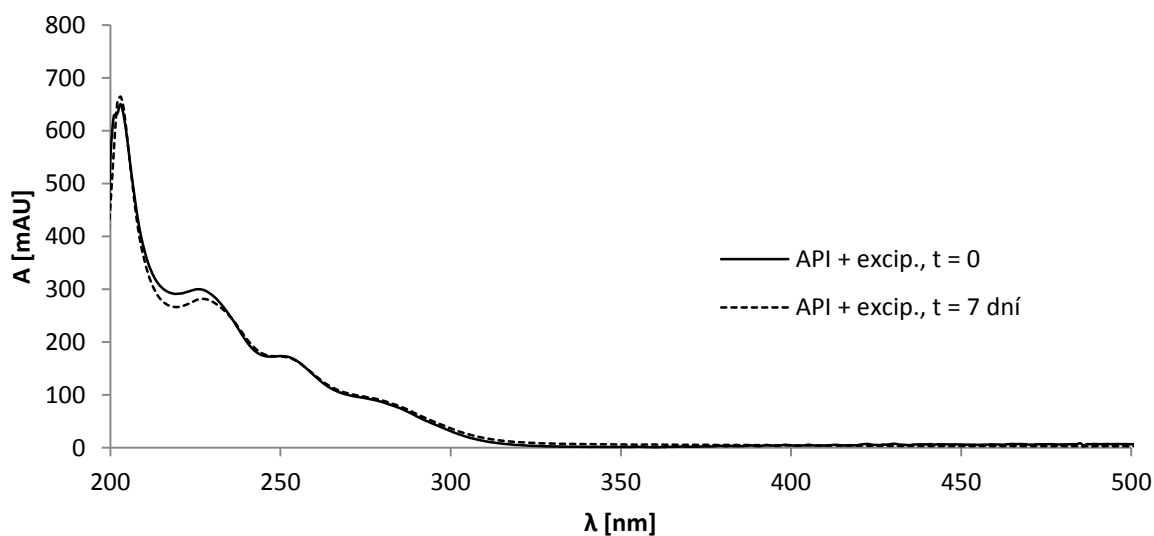
Používanou tabletu léčebného přípravku s vortioxetinem jako účinnou látkou jsem neměla k dispozici a proto jsem tabletu simulovala přidavkem všech excipientů v tabletě obsažených. Nejprve jsem ověřila, zda žádný z excipientů neinterferuje se stanovením vortioxetinu. Připravila jsem si methanolové roztoky excipientů. Většina z nich se ani za použití ultrazvukové lázně nerozpustila a tak jsem je přefiltrovala (viz tabulka 3). Zjistila jsem, že jediný pík ve stejném čase jako pík vortioxetinu je vidět při měření roztoku s oxidem železitým. Zkusila jsem pík oddělit od píku vortioxetinu změnou pH^* základního

elektrolytu přibližně o jednotku na obě strany, ale píky vortioxetinu a interferující pík měly časy pořád stejné. Jelikož byl pík vidět u roztoku obsahujícího oxid železitý, měla jsem podezření, že se jedná o pík železitých iontů. Proto jsem zkusila přidat k roztoku thiokianatan draselný, který tvoří s železitými ionty komplex. Změřila jsem vzorek připravený smícháním roztoku oxidu železitého s roztokem thiokyanatanu draselného v poměru 1:1 a vzorek připravený smícháním roztoku směsi excipientů a roztoku thiokyanatanu draselného v poměru 1:1. Zjistila jsem, že přídavek roztoku thiokianatanu draselného skutečně funguje a žádný pík už vidět není. Zkusila jsem použít menší množství thiokyanatanu draselného a změřila jsem vzorek připravený smícháním roztoku směsi excipientů s roztokem thiokyanatanu draselného v poměru 10:1, ani zde si pík železitých iontů nevyskytoval. Pro ověření, zda se skutečně jednalo o pík železitých iontů, jsem si připravila a změřila roztok dusičnanu železitého. Žádný pík se ale v daném čase neobjevil. Interferující pík tedy nezpůsobují konkrétně železité ionty, přesto ale přídavek thiokianatanu draselného pomáhá interferující pík odstranit. Od této chvíle jsem tedy každý vzorek dávkovala v obj. poměru 9:1 měřeného roztoku ku roztoku thiokyanatanu draselného o koncentraci 10 mg/ml.

Abych ověřila stabilitu připravených roztoků připravila jsem si vzorek UV-A obsahující vortioxetin v methanolu a vzorek UV-B obsahující vortioxetin a excipienty v methanolu. Po přefiltrování a neředění jsem na spektrofotometru změřila jejich UV spektrum. Dále jsem baňky s roztoky nechala stát 7 dní za laboratorní teploty a opět proměřila jejich UV spektrum. Tato spektra (viz obr. 10, 11) se prakticky nelišila a lze tak považovat roztoky v těchto podmínkách za stabilní.

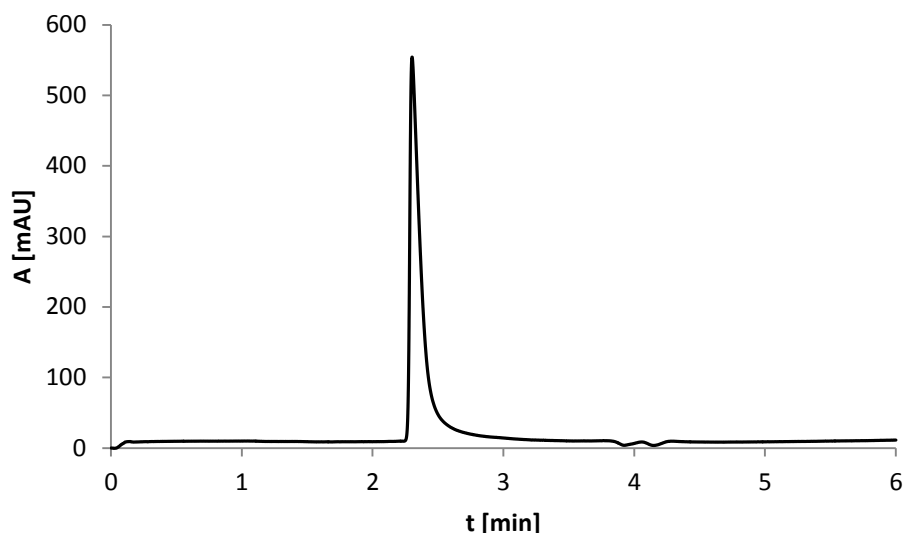


Obrázek 10 UV spektrum vzorku UV-A obsahujícího vortioxetin měřeného hned a po 7 dnech kdy byl roztok v baňce za laboratorní teploty



Obrázek 11 UV spektrum vzorku UV-B obsahujícího vortioxetin a excipienty měřeného hned a po 7 dnech kdy byl roztok v baňce za laboratorní teploty

Dále jsem přistoupila k naměření kalibrační závislosti. Připravila jsem si 8 kalibračních roztoků v rozsahu 0,0005 až 1,0 mg/ml vortioxetinu a slepý vzorek. Kalibrační roztoky i slepý vzorek obsahovaly také navážku excipientů a byly přefiltrovány. Každý kalibrační bod jsem změřila třikrát. Ukázka elektroferogramu kalibračního roztoku o nejvyšší koncentraci je na obr. 12.



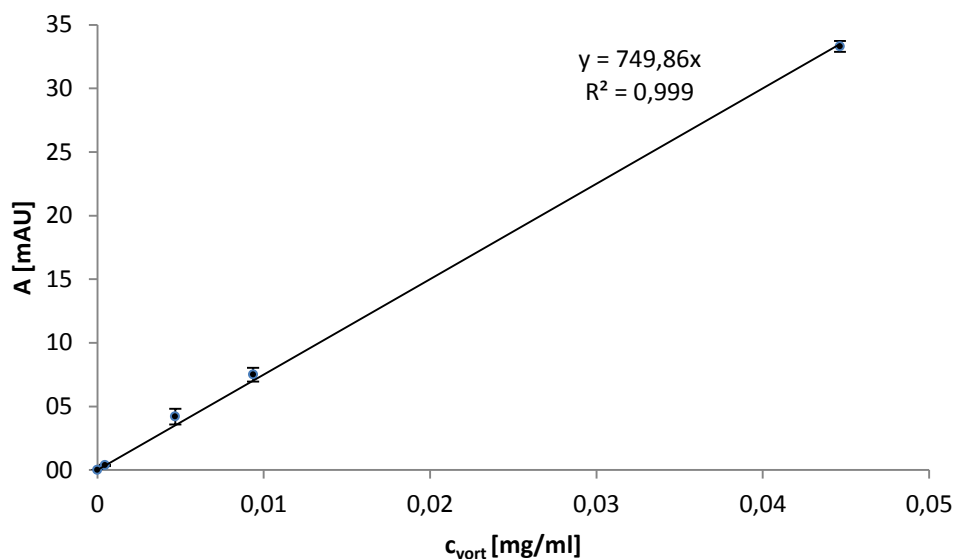
Obrázek 12 Elektroferogram kalibračního roztoku o koncentraci 1 mg/ml

Nejprve jsem pro určení mezí detekce a kvantifikace odečetla výšky píku u prvních čtyř kalibračních bodů. Z mediánu ze tří měření jsem sestavila kalibrační závislost výšky píku na koncentraci. Odečtené hodnoty jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka 12).

Tabulka 12 Odečtené hodnoty výšky píku z měření kalibračních roztoků (medián ze tří měření)

	c [mg/ml]	h (medián) [mAU]	RSD (n=3) [%]
blank	0,00000	0,0	-
1	0,00045	0,4	2,3
2	0,0047	4,2	10,8
3	0,0094	7,5	1,1
4	0,045	33,3	3,0

Z těchto hodnot jsem vynesla do grafu kalibrační závislost výšky píku na koncentraci vortioxetinu (Obrázek 13). Regresní přímka, která prochází počátkem, měla tvar $y = 749,86x$ a koeficient determinace $R^2 = 0,999$



Obrázek 13 Kalibrační závislost výšky píku vortioxetinu na jeho koncentraci

U tří měření kalibračního roztoku o nejnižší koncentraci jsem pomocí vyhodnocovacího programu určila výšku šumu před a za píkem vortioxetinu. Těchto šest hodnot (viz Tabulka 13) jsem zprůměrovala a za použití regresní rovnice ze závislosti výšky píku na koncentraci spočítala mez detekce (LOD) a mez kvantifikace (LOQ). (viz Tabulka 14).

Tabulka 13 Odečtené hodnoty výšek šumu ze tří měření kalibračního roztoku o nejnižší koncentraci pro výpočet LOD a LOQ

měření č.	výška šumu před píkem vortioxetinu [mAU]	výška šumu za píkem vortioxetinu [mAU]
1	0,1064	0,1216
2	0,0959	0,0995
3	0,1521	0,0744
průměr	0,1083 mAU	

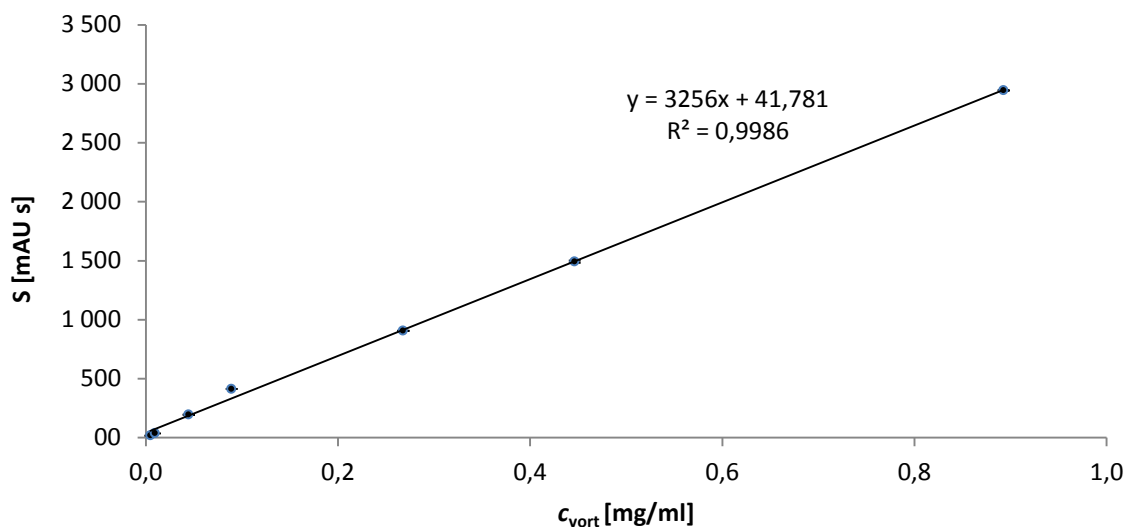
Tabulka 14 Vypočtené hodnoty LOD a LOQ z kalibrační závislosti

	c [mg/ml]	c [mmol/l]
LOD	0,00043	0,0011
LOQ	0,0014	0,0038

Dále jsem provedla integraci plochy píku vortioxetinu u všech kalibračních roztoků a sestrojila kalibrační závislost plochy píku vortioxetinu na koncentraci (obr. 14). Pro sestrojení kalibrační závislosti jsem použila medián ze tří měření. Odečtené hodnoty jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka 15). Po sestrojení grafu jsem odečetla regresní rovnici $y = 3256x + 41,781$ a korelační koeficient $R^2 = 0,9986$, lineární dynamický rozsah byl přes celý kalibrační rozsah, tedy 0,0047 – 0,893 mg/ml.

Tabulka 15 Hodnoty získané z měření kalibračních roztoků

kal. bod č.	c [mg/ml]	S (medián) [mAU s]	RSD (n=3) RSD [%]
2	0,0047	18,2	3,4
3	0,0094	37,4	1,4
4	0,045	195	0,2
5	0,089	413	2,6
6	0,268	906	0,4
7	0,456	1490	0,9
8	0,893	2940	0,5



Obrázek 14 Kalibrační závislost plochy píku vortioxetinu na koncentraci

4.2.2. Měření kontrolních a stabilitních vzorků

Abych si ověřila přesnost a preciznost, připravila jsem si kontrolní vzorek, který obsahoval jak vortioxetin tak excipienty. Vzorek jsem změřila desetkrát po sobě (měření A (I)) a statisticky vyhodnotila. Stejný vzorek jsem desetkrát po sobě změřila znovu jiný den (měření A (II)) a získaná data opět statisticky vyhodnotila. Připravila jsem si také druhý kontrolní vzorek B o nižší koncentraci a změřila ho pětkrát po sobě. Získané výsledky z měření kontrolních vzorků jsou shrnuty v následující tabulce (Tabulka 16).

Tabulka 16 Výsledky získané z měření kontrolních vzorků A a B

	počet měření	c_{vz} (správná) [mg/ml]	c (medián) [mg/ml]	c (rozpětí) [mg/ml]	odchylka mediánu od správné hodnoty [%]	RSD [%]
vzorek A (I)	10	0,374	0,370	0,023	-1,23	1,98
vzorek A (II)	10	0,374	0,387	0,041	3,43	3,38
vzorek B	5	0,046	0,046	0,001	-0,76	0,93

Odchylka naměřené koncentrace od skutečné koncentrace se u měření A (I) pohybovala od -4,08 do 2,01 %, u měření A (II) od -1,56 do 9,28 % a u měření vzorku B od -1,14 do 1,27 %. Jak je vidět v tabulce 15, odchylka mediánu od správné hodnoty se vždy pohybovala do 4 % a relativní směrodatná odchylka z měření se pohybovala také do 4%.

Dále jsem ověřila robustnost metody vůči vlivům změny teploty separačního prostředí o plus a minus 5 °C a vůči vlivu změny pH* základního elektrolytu asi o jednu jednotku. Teplota separačního prostředí v metodě je 25 °C a tak jsem provedla tři měření vzorku A při teplotě 20 °C a tři měření vzorku A při teplotě 30 °C. Mnou používaný základní elektrolyt má pH* = 5,53 a tak jsem provedla tři měření vzorku A s použitím základního elektrolytu o pH* = 4,60 a tři měření vzorku A s použitím základního elektrolytu o pH* = 6,42. Získané výsledky jsou shrnuty v následující tabulce (Tabulka 17).

Tabulka 17 Výsledky získané při měření robustnosti na vzorku A o koncentraci 0,374 mg/ml

			medián	c (rozpětí)	odchylka mediánu od správné hodnoty	RSD (n=3)
	t [°C]	pH*	c [mg/ml]	c [mg/ml]	[%]	[%]
změna teploty - 5 °C	20	5,53	0,374	0,015	-0,19	1,71
změna teploty + 5 °C	30	5,53	0,372	0,018	-0,60	1,96
snížení pH* zákl. elektrolytu	25	4,60	0,356	0,001	-4,93	0,15
zvýšení pH* zákl. elektrolytu	25	6,42	0,358	0,007	-4,41	0,85

Z naměřených výsledků lze usuzovat, že malá změna teploty separačního prostředí nemá viditelný vliv na přesnost ani preciznost výsledků, odchylka naměřených koncentrací od správné hodnoty se pohybovala pod 4 % a směrodatná odchylka ze tří měření byla pod 2 %. Malá změna pH* základního elektrolytu také nemá výrazný vliv na přesnost ani preciznost výsledků, odchylka naměřených koncentrací od správné hodnoty se pohybovala pod 6 % a směrodatná odchylka ze tří měření byla pod 1 %.

Dalším cílem bylo ověřit stabilitu vortioxetinu v tabletě. Tabletě jsem k dispozici neměla, ale simulovala jsem ji smícháním vortioxetinu se všemi excipienty obsaženými v reálné tabletě. Připravila jsem si vzorek C obsahující vortioxetin i excipienty a vzorek D obsahující jen vortioxetin. Dané látky jsem po navážení (ve formě prášku) vystavila teplotě 40 °C a 75% rel. vlhkosti vzduchu po dobu 10 dnů a po vyjmutí jsem z nich připravila

methanolový roztok, který jsem třikrát změřila. Výsledky jsou uvedeny v tabulce níže (Tabulka 18).

Tabulka 18 Výsledky získané z měření vzorku C obsahujícího vortioxetin a excipienty a vzorku D obsahujícího jen vortioxetin vystavených ve formě prášku teplotě 40 °C a 75% rel. vlhkosti vzduchu po dobu 10 dnů

	c_{vz} (původní)	c (medián)	c (rozpětí)	odchylka mediánu od správné hodnoty	RSD (n=3)
	[mg/ml]	[mg/ml]	[mg/ml]	[%]	[%]
vzorek C	0,367	0,359	0,001	-2,30	0,12
vzorek D	0,382	0,364	0,004	-4,63	0,41

Elektroferogramy nevykázaly žádný nový viditelný pík, který by mohl patřit nějakému rozkladnému produktu a co je podstatné, ani odchylka koncentrace vortioxetinu od původní koncentrace není výraznější než u předchozích měření a lze tedy říci, že za těchto podmínek je vortioxetin stabilní jak ve formě prášku samotného vortioxetinu, tak ve formě prášku vortioxetinu smíchaného s excipienty.

Stabilitu jsem ověřila ještě za vyšší teploty. Obdobně jako vzorky C a D jsem připravila vzorek E obsahující vortioxetin a excipienty a vzorek F obsahující jen vortioxetin. Po navážení jsem tyto látky vystavila (ve formě prášku) teplotě 80 °C a 75% rel. vlhkosti vzduchu po dobu 4 dnů a po vyjmutí jsem z nich připravila methanolový roztok, který jsem třikrát změřila. Výsledky získaných měření vzorku E naznačovaly, že vortioxetin se z části rozložil. Abych tento závěr ověřila, obdobným způsobem jako vzorek E jsem připravila a změřila vzorek G. Výsledky jsou uvedeny v tabulce níže (Tabulka 19).

Tabulka 19 Výsledky získané z měření vzorků E, G obsahujících vortioxetin a excipienty a vzorku F obsahujícího jen vortioxetin vystavených ve formě prášku teplotě 80 °C a 75% rel. vlhkosti vzduchu po dobu 4 dnů

	c_{vz} (původní) [mg/ml]	c (medián) [mg/ml]	c (rozpětí) [mg/ml]	odchylka mediánu od správné hodnoty [%]	RSD (n=3) [%]
vzorek E	0,356	0,277	0,012	-22,19	1,78
vzorek F	0,338	0,338	0,003	-0,07	0,43
vzorek G	0,346	0,282	0,020	-18,30	3,22

Při měření vzorku F nebyl na elektroferogramu vidět žádný nový pík a ani koncentrace vortioxetinu se nezměnila a lze tedy říci, že samotný vortioxetin ve formě prášku je za těchto podmínek stabilní. Jiná situace nastala u měření vzorků E a G. Na elektroferogramech se sice žádný nový pík nevyskytoval, tedy alespoň v oblasti kationtů a neutrálních látek, ale odchylka naměřené koncentrace od původní byla u vzorku E až -24,16 % a u vzorku G až -23,32 %. Tato odchylka už je výrazně vyšší než odchylka u kontrolních vzorků. Závěr je tedy takový, že pokud je vortioxetin vystaven výše zmíněným podmínkám spolu se všemi excipienty (vše ve formě prášku), není zcela stabilní a dojde k jeho degradaci přibližně z 20 %. Jelikož jsem degradační produkt na elektroferogramu nepozorovala, jde s největší pravděpodobností o látku, která buď neabsorbuje záření v UV oblasti, nebo migruje v oblasti, kterou jsem již nezaznamenávala (oblast aniontů). Jednoznačně je zde vliv některého z excipientů, který buď spolupůsobí degradační produkt či napomáhá jeho vzniku, ovšem jen za vysoké teploty (80 °C), kdy degradační reakce probíhají rychleji. Při obdobném experimentu za teploty 40 °C jsem tento jev ještě nepozorovala.

5. Závěr

- Zjistila jsem, že vortioxetin tvoří supramolekulární komplex s nativními cyklodextriny (α -CD, β -CD, γ -CD). Z měření jsem výpočtem odhadla hodnotu konstanty stability těchto komplexů ($\beta_{\alpha\text{-CD}} = 479 \text{ l/mol}$, $\beta_{\beta\text{-CD}} = 3191 \text{ l/mol}$, $\beta_{\gamma\text{-CD}} = 1103 \text{ l/mol}$) a určila tak, že nejstabilnější komplex tvoří vortioxetin s β -CD.
- Vyvinula jsem metodu pro kapilární elektroforézu v nevodném prostředí pro stanovení vortioxetinu v tabletě a sestrojila kalibrační závislost. Touto metodou jsem změřila kontrolní vzorky a výsledky statisticky zpracovala. Ověřila jsem přesnost, preciznost a robustnost metody. Hodnoty relativních směrodatných odchylek jsou u měření touto metodou vyšší, než bývá zvykem u metod na HPLC, ale CZE je založena na jiném principu separace a může tak posloužit k ověření výsledků získaných na HPLC.
- Zkoumala jsem stabilitu samotného vortioxetinu a vortioxetinu s excipienty (vše ve formě prášku) za teploty 40°C a 75% rel. vlhkosti vzduchu po dobu 10 dnů a za teploty 80°C a 75% rel. vlhkosti vzduchu po dobu 4 dnů. Jediný vzorek, který se ukázal být ne zcela stabilní, byl vzorek obsahující vortioxetin i excipienty vystavený podmínkám 80°C a 75% rel. vlhkosti vzduchu po dobu 4 dnů, kde došlo k poklesu koncentrace vortioxetinu přibližně o 20 %.

6. Použité zkratky

- FDA – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv v USA (Food and Drug Administration)
- HPLC – vysokotlaká kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
- DAD – detektor diodového pole (diode array detector)
- NMR – nukleární magnetická rezonance
- DEPT – NMR technika (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)
- IČ – infračervená spektroskopie
- BGE – základní elektrolyt (Back Ground Electrolyte)
- NACE – nevodná kapilární elektroforéza (Nonaqueous Capillary Electrophoresis)

7 Literatura

- ¹ Příbalová informace (Brintellix 10 mg potahované tablety, Lundbeck A/S) **05.2016**
- ² Mohr, P.; Anderes, M.; Masopust, J. *Psychiatrie* **2014**, 18 (4), 206-211
- ³ Mohr, P.; Melicher, T.; Knytl, P. *Psychiatrie pro praxi* **2016**, 17 (1) 31-33
- ⁴ Látalová, K. *Remedia* **2014**, 24, 226-228
- ⁵ EMA/699150/2013, Procedure No. EMEA/H/C/002717 **2013**
- ⁶ Bang-Andersen, B.; Ruhland, T.; Jorgensen, M.; Smith, G.; Frederiksen, K.; Jensen, K. G.; Zhong, H.; Nielsen, S. M.; Hogg, S.; Mork, A.; Stensbol, T. B. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, 54 (9) 3206–3221
- ⁷ Vetchý, D.; Frýbortová, K.; Rabišková, M.; Häring, A. *Chemické listy* **2006**, 100, 24-29
- ⁸ Theo van de Ven, Louis Godbout, *Cellulose - Fundamental Aspects*, InTrch, 2013, 376 stran, ISBN 978-953-51-1183-2
- ⁹ Chimenti, R.; Elliott, J.; Bux, R. A. *American Pharmaceutical Review* **2015**
- ¹⁰ Martin Del Valle, E. M. *Process Biochemistry* **2004**, 39, 1033–1046
- ¹¹ Seilkhanov, T. M.; Nazarenko, L. A.; Poplavskii, N. N.; Seilkhanov, O. T.; Iskakova, T. K.; Praliev, K. D.; Abzhapparov, A. A.; Zharkinbekov, T. N. *Russian Journal of General Chemistry*, **2016**, 86(1), 110–115
- ¹² Garnaik, B. K.; Dash, S. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **2015**, 7(5), 102-108
- ¹³ Trapani, A.; De Laurentis, N.; Armenise, D.; Carrieri, A.; Defrenza, I.; Rosato, A.; Mandracchia, D.; Tripodo, G.; Salomone, A.; Capriati, V.; Franchini, C.; Corbo, F. *International Journal of Pharmaceutics*, **2016**, 497, 18–22
- ¹⁴ Liu, L.; Cao, N.; Ma, X.; Xiong, K.; Sun, L.; Zou, Q.; Yao, L. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2016**, 117, 325–332
- ¹⁵ Gu, E.; Huang, Ch.; Liang, B.; Yuan, L.; Lan, T.; Hu, G.; Zhou, H. *Journal of Chromatography B* **2015**, 997, 70–74
- ¹⁶ Douša, M.; Klvaňa, R.; Doubský, J.; Srbek, J.; Richter, J.; Exner, M.; Gibala, P. *Journal of Chromatographic Science* **2016**, 54 (2), 119–124
- ¹⁷ Kall, M. A.; Rohde, M.; Jørgensen, M. *Bioanalysis* **2015**, 7 (22), 2881-2894
- ¹⁸ Huang, Y.; Zheng, S.; Pan, Y.; Lic, T.; Xu, Z.; Shao, M. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2016**, 128, 184–190

- ¹⁹ Cirri, M.; Maestrelli, F.; Orlandini, S.; Furlanetto, S.; Pinzauti, S.; Mura, P. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2005**, 37, 995–1002
- ²⁰ Berglund, J.; Cedergren, L.; Andersson, S. B. *International Journal of Pharmaceutics* **1997**, 156, 195–200
- ²¹ Toth, G.; Mohacsi, R.; Racz, A.; Rusu, A.; Horvath, P.; Szente, L.; Beni, S.; Noszal, B. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2013**, 77, 291–300
- ²² Popova, O. V.; Sursyakova, V. V.; Burmakina, G. V.; Levdansky, V. A.; Rubaylo, A. I. *Doklady Chemistry* **2015**, 461 (1), 67–69
- ²³ Li, N.; Duan, J.; Chen, H.; Chen, G. *Talanta* **2003**, 59, 493–499
- ²⁴ Geiser, L.; Veuthey, J.-L. *Electrophoresis* **2007**, 28, 45–57
- ²⁵ Geiser, L.; Veuthey, J.-L. *Electrophoresis* **2009**, 30, 36–49
- ²⁶ Zhou, L.; Wang, W.; Wang, S.; Hui, Y.; Luo, Z.; Hu, Z. *Analytica Chimica Acta* **2008**, 611, 2, 212–219
- ²⁷ Ghowsi, K.; Ghowsi, H. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* **2013**, 4, 514–522
- ²⁸ Alagar Raja, M.; Bhargav, K. S.; Banji, D.; Selva Kumar, D. *Journal of Chromatography and Separation Techniques* **2014**, 5, 1000231/1–1000231/6